Zur quantitativen Bestimmung des freien —Aminostickstoffs im 24 h—Urin von 250 gesunden Erwachsenen mittels einer modifizierten Ninhydrin—Reaktion

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jürgen Schombert

Saarbrücken

1972

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität
des Saarlandes

Zur quantitativen Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs im 24 h-Urin von 250 gesunden Erwachsenen mittels einer modifizierten Ninhydrin-Reaktion

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von

Jürgen Schombert

geb. am 9. 1. 1945 in Jägersburg

Dekan: Prof. Dr. med. H. KULENKAMPFF

Referent: Prof. Dr. med. D. MÜTING

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 10. März 1972 abgelegt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
II. METHODIK ZUR BESTIMMUNG DER FREIEN α-AMINOSÄUREN	3
A. Vorbemerkungen	3
B. Chemismus und Prinzip der Methode	12
C. Bestimmung des freien α-Amino-N im 24 h-Urin	16
D. Zusammenfassung der methodischen Verbesserungen	2o
E. Brauchbarkeit	29
F. Empfindlichkeit	29
G. Spezifität	3o
H. Richtigkeit und Genauigkeit	3o
III. UNTERSUCHUNGSMATERIAL	33
IV. ERGEBNISSE	48
V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	53
VI. ZUSAMMENFASSUNG	59
VII. LITERATURVERZEICHNIS	64

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Für die Beurteilung des Eiweißabbaus ist die Bestimmung der täglichen Aminosäurenausscheidung im Harn von großer theoretischer und praktischer Bedeutung. Sie wird auch als Aminoacidurie bezeichnet. Dabei bestimmt man entweder die einzelnen Aminosäuren mittels Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie oder ihre Summe als freien α-Aminostickstoff.

Störungen im intermediären Stoffwechsel können zur Folge haben, daß die Konzentration einiger Aminosäuren im Plasma soweit ansteigt, daß es zur Aminoacidurie kommt. Deswegen kann eine Bestimmung der täglichen Aminosäurenausscheidung im Harn ein empfindlicher Maßstab sein für Veränderungen im intermediären Stoffwechsel. Die Kenntnis einer Hyperaminoacidurie ist für die Diagnostik von angeborenen Stoffwechselleiden, Leber- und Nierenkrankheiten von großer Bedeutung.

Methoden zur Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs sind bereits seit Beginn des Jahrhunderts bekannt. Unter anderem wurde zur quantitativen Erfassung des α-Aminostickstoffs die Formoltitration verwendet.

Nach dem Kriege wurden zuerst die Komplexbildung mit Kupfersalzen und später die seit langem bekannte Farbreaktion mit Ninhydrin zur quantitativen Bestimmung der freien α-Aminosäuren vorgeschlagen.

Die Genauigkeit und Spezifität der Ninhydrinmethode wurde dann von MOORE und STEIN (11) im Jahre 1954 anhand säulenchromatographischer Untersuchungen von Aminosäurengemischen sowie von enteiweißten Seren und Urinen nachgewiesen.

MÜTING (14) modifizierte 1954 die Methode für klinische Routinezwecke. Spätere Verbesserungen stammen aus dem Jahre 1963 (MÜTING und KAISER (16)). Bis jetzt fehlten aber noch Angaben über die Genauigkeit des Verfahrens, wie sie durch die grundlegenden Arbeiten von BÜTTNER und STAMM (1) 1966 als Voraussetzung für eine exakte Routinemethode verlangt werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es deswegen sein, die quantitative Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs mittels der durch MÜTING und KAISER (16) modifizierten Ninhydrinreaktion noch einmal nachzuarbeiten, nach möglichen Fehlerquellen und Verbesserungen zu suchen und schließlich

eine Qualitätskontrolle nach BÜTTNER und STAMM (1) durchzuführen.

Schließlich sollten im Vergleich mit früheren Arbeiten 25o gesunde Erwachsene auf ihre tägliche Urinausscheidung an freiem α-Aminostickstoff untersucht werden.

II. METHODIK ZUR BESTIMMUNG DER FREIEN α-AMINOSÄUREN

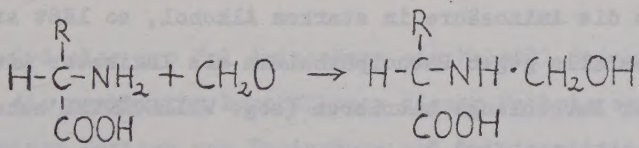
A. Vorbemerkungen

Die unterschiedlichen Literaturangaben der Normalwerte gehen wohl auf die Verschiedenheit der angewandten Methoden zurück. Die Bestimmung von α-Aminostickstoff im 24 h-Urin ist auf vielerlei Weise möglich. Die gebräuchlichsten seien hier kurz aufgezählt.

Schon mit älteren Verfahren, wie der Formoltitration in der Modifikation von YOSHIDA (3o), der gasometrischen van SLYKE-Methode (22) und der Titration in alkoholischer Lösung (WILLSTÄTTER (29)) bzw. Aceton (LINDERSTRÖM-LANG (8)) wurde eine nicht unbeträchtliche Menge von Aminostickstoff im

menschlichen Harn nachgewiesen. Je nachdem, ob mit der betreffenden Methode nur freie oder peptidgebundene Aminosäuren erfaßt werden, liegen die Aminostickstoff-Werte, die die einzelnen Autoren gefunden haben, zwischen 1oo und 1ooo mg. Nach der Zusammenstellung von CREMER und FÜHR (2) werden beim normalen Erwachsenen etwa 4oo bis 1ooo mg Aminostickstoff/die ausgeschieden. Das macht je nach der Ernährungslage o,5 bis 1 % der Gesamtstickstoffausscheidung aus.

Bei der Formoltitration in der Modifikation von YOSHIDA (3o) wird in Gegenwart von Aldehyden (Formaldehyd) die basische Natur der Aminogruppe abgeschwächt, dadurch daß der Aldehyd sich an den Stickstoff anlagert. In schematischer Schreibweise:



Die Aminosäure läßt sich nun mit Hilfe eines geeigneten Indikators (gewöhnlich Phenolphthalein oder Thymolphthalein) mit Alkali titrieren. Auf diesem Prinzip ist die "titrimetrische Bestimmung der freien Aminogruppen" aufgebaut.

III. [illegible]

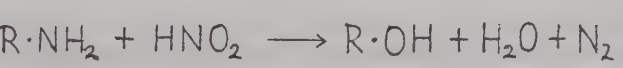
Infolge der Zwitterionenstruktur der Aminosäuren wird bei Zusatz von Alkali die Aminogruppe titriert. Dieselbe geht dabei vom ionisierten in den ungeladenen Zustand über, indem sie ein H^+-Ion verliert. Die Aminogruppe ist aber erst bei stark alkalischer Reaktion (pH 12) zu Ende titriert. Für die Erkennung des Endpunktes gibt es keinen geeigneten Indikator. Setzt man dagegen Formaldehyd zu der Lösung, so wird die Titrationskurve um mehrere pH-Einheiten ins Saure verschoben als Folge der Anlagerung des Aldehyds an die Aminogruppe. Sie ist nun schon bei pH 8 zu Ende titriert; der pH-Wert ändert sich dort sprungartig und deshalb kann der Endpunkt der Titration durch einen Indikator, der in diesem Bereich umschlägt, exakt festgestellt werden.

Löst man die Aminosäure in starkem Alkohol, so läßt sie sich ebenfalls gegen Phenolphthalein als Indikator mit alkoholischer Natronlauge titrieren (sog. WILLSTÄTTER'sche Alkoholtitration (29)).

Man kann an Stelle des Alkohols auch andere Lösungsmittel verwenden, z.B. Aceton. In Aceton können Aminosäuren mit Säure titriert werden, wobei Naphthylrot als Indikator verwendet wird (Methode von LINDERSTRÖM-LANG (8)):

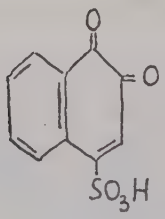
In diesem Fall scheint eine tatsächliche Abschwächung der Säurefunktion durch das Lösungsmittel stattzufinden.

Endlich zeigen die Aminosäuren als "primäre Amine" ein Verhalten gegen salpetrige Säure, das auch zu ihrer Bestimmung verwendet werden kann. Bekanntlich reagieren "primäre Amine" nach der folgenden Gleichung:



Es wird also pro Mol Aminosäure ein Molekül Stickstoff frei. Für die praktische Durchführung dieser Methode setzt man zu einem Gemisch von Essigsäure und Natriumnitrit die Lösung einer Aminosäure zu und schüttelt etwa 5 min. lang. Die entstehenden nitrosen Gase werden in alkalischem Permanganat absorbiert. Man verwendet zur Durchführung den sinnreich konstruierten Apparat von van SLYKE (22), der es gestattet, die gebildete Gasmenge zu messen.

Weit verbreitete Anwendung, besonders in der klinischen Chemie, hat auch eine von FOLIN (5) angegebene Methode gefunden, die auf einer Farbreaktion mit der 1,2-Naphthochinon-4-sulfosäure bei Gegenwart von Alkali beruht. Ammoniak, das ebenfalls reagiert, muß vorher entfernt werden:



FOLIN'sches Aminosäuren-Reagens

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung von Aminosäuren seien hier kurz gestreift:

a) Erste Versuche einer verbesserten Trennung von Aminosäuren wurden 1901 von FISCHER (4) durchgeführt. Das salzsaure Hydrolysat einer größeren Menge von Protein wurde mit Äthylalkohol verestert und durch fraktionierte Destillation getrennt.

b) Kupfer-Ionen bilden mit Aminosäuren Komplexsalze, die verschiedene Löslichkeit haben. Die Methode wird heute

in der Modifikation von POPE und STEVENS (18) angewandt.

c) In neuerer Zeit hat die Bestimmung einzelner Aminosäuren auf biologischem Weg Bedeutung erlangt. Es ist möglich gewesen, auf der Grundlage der "mikrobiologischen Bestimmungsmethode" sehr exakt die Bestimmung fast aller wichtigen Aminosäuren auszuarbeiten. Die Mikroorganismen sind auf diese Weise zu wichtigen Reagenzien im biochemischen Laboratorium geworden.

d) Bestimmung mit Hilfe von isotopen-markierten Aminosäuren: Gibt man zu einem Aminosäuren-Gemisch eine mit ^{15}N markierte Aminosäure, so mischt sich dieser ^{15}N mit dem N der in der Lösung vorhandenen entsprechenden Aminosäure. Deren Menge läßt sich aus der Minderung der Konzentration des ^{15}N-Isotops berechnen.

e) Elektrophoretisch: Lassen sich sowohl Aminosäuren wie Eiweißstoffe trennen (Methode nach TISELIUS (28)) und schließlich

f) Trennung der einzelnen Aminosäuren mit Hilfe der Chromatographie ist möglich.

Chromatographie ist praktisch eine Adsorptionsanalyse. Farblose Stoffe wie Aminosäuren werden kolorimetrisch durch Bestimmung des violetten Ninhydrin-Farbstoffes erfaßt. Wir unterscheiden verschiedene Arten und Weiterentwicklungen der

Chromatographie, wie die Säulen-, die Durchlauf-, die Papier- und Dünnschichtchromatographie. Benützt man einen quadratischen Streifen, so läßt sich die zweidimensionale Methode anwenden. Stoffe, die das erste Mal gleich weit mitgenommen wurden, können auf diese Weise noch getrennt werden. Die Methode ist heute unentbehrlich bei der Trennung der verschiedenen Aminosäuren. Alle anderen bisher bekannten Methoden waren entweder zu ungenau oder zu schwierig und zeitraubend, als daß sie sich in der Klinik durchgesetzt hätten.

Erst in jüngster Zeit ist es durch die Einführung der PCG (Papierchromatographie) und mikrobiologische Aminosäurenanalysen möglich geworden, den größten Teil der Harnaminosäuren zu identifizieren und auch quantitativ zu erfassen. Dabei handelt es sich vor allem um Analysen leichter bestimmbarer Aminosäuren bei einzelnen Gesunden. Eine quantitative Zusammenstellung aller im nativen und hydrolysierten menschlichen Urin vorkommenden Aminosäuren bei 4o gesunden Erwachsenen stammt von MÜTING.

Dabei stellte MÜTING (14) fast völlige Übereinstimmung

zwischen dem nach MOORE und STEIN (11) und POPE und STEVENS (18) gefundenen α-Aminostickstoffgehalt und der Summe der auf α-Aminostickstoff berechneten einzelnen Aminosäuren-Werte, die papierchromatographisch bestimmt wurden, fest. Die Summe der auf α-Aminostickstoff berechneten papierchromatographisch erfaßten Aminosäuren ist nur etwa 1o % geringer als der nach MOORE und STEIN (11) gefundene Gehalt an α-Aminostickstoff.

Eine quantitative Bestimmung der meisten Harnaminosäuren mittels PCG ist für klinische Zwecke grundsätzlich möglich. Für Routineuntersuchungen in nicht entsprechend ausgerüsteten klinischen Laboratorien erscheint dagegen eine quantitative Bestimmung der einzelnen Harnaminosäuren nicht angebracht.

Eine einfache Versuchsanordnung, die auch in einem Krankenhaus ohne größeren Aufwand an Apparaten und Reagenzien möglich ist, geht von der Methode nach MOORE und STEIN (1o) aus. Hier wird durch einen Zusatz von Zinn-(II)-chlorid eine Steigerung der Empfindlichkeit sowie ein weitgehend gleicher Extinktionskoeffizient für alle Aminosäuren erreicht. Nachteile dieser Methode sind folgende:

1. Eine leichte Trübung, die sich schon beim frisch angesetzten Reagenz zeigte.
2. Die Reaktion wird durch Ammoniak erheblich gestört, der nach den Erfahrungen von MOORE und STEIN (10) den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten wie Aminosäuren gibt.

Durch Änderung der Puffer und Lösungsmittel sowie Weglassen des Reduktionsmittels und genauer Festlegung der optimalen Kochzeiten kamen MÜTING und KAISER (16) 1963 zu einer wesentlichen Verbesserung dieser Methode, die nun nicht mehr nur auf Eluate von Chromatogrammen, sondern auch auf biologische Materialien anwendbar ist.

Ein Vorteil war, daß die Zahl der Ansätze pro Zeiteinheit wesentlich erhöht wurde, außerdem, daß die Enteiweißung nicht mehr in einem getrennten Schritt durchgeführt werden mußte.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, die noch vorhandenen Mängel dieser Methode zu beseitigen und nach möglichen Verbesserungen der Methode zu suchen. Mängel bestanden in der Verschlußmöglichkeit der Testgläschen, der Höhe der Kochtemperatur und der Länge der Kochdauer der Proben.

B. Chemismus und Prinzip der Methode (7)

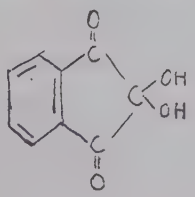
MOORE und STEIN (1o) haben erstmalig eine zuverlässige Methode ausgearbeitet. Sie setzen dem Ninhydrin Zinn-(II)-chlorid zu, wodurch die Empfindlichkeit der Reaktion wesentlich gesteigert wird und wodurch alle Aminosäuren /Mol praktisch dieselbe Farbintensität ergeben. Das ist die

Kolorimetrische Bestimmung der Aminosäuren mit Ninhydrin nach S. MOORE und W.H. STEIN (1o, 11)

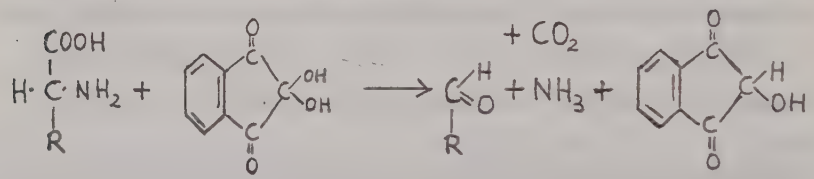
Hierbei ergeben Prolin und Oxyprolin eine Orangefärbung mit einer maximalen Absorption bei 44o m/µ in dem Gemisch einer Lösung von Propanol-Wasser (1:1o). Außerdem stört Ammoniak die Bestimmung und muß daher vorher entfernt werden. Diese Methode hat sich bei der Bestimmung von Aminosäuren durch Chromatographie bewährt.

Allgemeiner Reaktionsablauf:

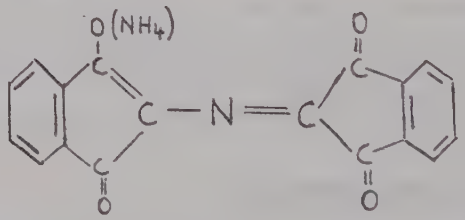
Alle α-Aminosäuren geben, wenn sie in neutraler Lösung mit Ninhydrin erwärmt werden, eine intensiv blaue oder violette Färbung. Ninhydrin ist die abgekürzte Bezeichnung für das Triketohydrindenhydrat:



Bei dieser Reaktion wird die α-Aminosäure zunächst durch das Ninhydrin zu einem um ein C-Atom ärmeren Aldehyd oxydiert, wobei ein Molekül CO_2 freigesetzt wird (Decarboxylierung):

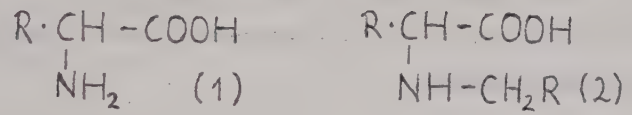


Das reduzierte Ninhydrin setzt sich nun mit dem Ammoniak und einem zweiten Molekül Ninhydrin zu einem Farbstoff um, der wahrscheinlich die folgende Konstitution hat und als Ammoniumsalz vorliegt:



Diese Kondensation, die nur bei einem pH über 2,5 stattfindet, entspricht durchaus der Bildung des Murexids bei der Oxydation der Harnsäure. Unterhalb pH 2,5 tritt keine Färbung ein.

Die Ninhydrinreaktion, eine der empfindlichsten Reaktionen der α-Aminosäuren, geben alle Substanzen der beiden allgemeinen Formeln.



Struktur 1: besitzen alle freien α-Aminosäuren
Struktur 2: weisen Prolin, Oxyprolin und Sarkosin auf

Die Ninhydrin-Methode dient zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren, wenn das bei der Decarboxylierung freiwerdende CO_2 gemessen oder der Farbstoff kolorimetrisch bestimmt wird. Die kolorimetrische Bestimmung des violetten Farbstoffs wird besonders im Zusammenhang mit den chromatographischen Methoden (MOORE und STEIN (1o)) verwendet.

Keine Reaktionen ergeben folgende Substanzen:

1. Aminosäuren-Derivate, in deren NH_2-Gruppe ein Wasserstoffatom durch die Gruppe -CO · R ersetzt ist, also alle Peptide und azylierten Aminosäuren. Die Peptide der Asparaginsäure und Glutaminsäure, bei denen die Atom-

gruppierung -CH · (NH_2) COOH frei ist, entwickeln selbstverständlich CO_2.

2. Aminosäuren-Derivate, in denen alle beide H-Atome der NH_2-Gruppe substituiert sind. Beispielsweise wird aus Monomethylglykokoll CO_2 abgespalten, nicht aber aus Dimethylglykokoll.

3. Aminosäuren-Derivate, in denen die Karboxylgruppe nicht frei ist, zum Beispiel alle Ester oder Säureamide.

4. NH_3, Amine, Glucosamin und dgl. Substanzen können kein CO_2 entwickeln und stören diese Art der Aminosäurenbestimmung nicht, während sie mit der "gasometrischen Amino-N-Bestimmung" (22) interferieren.

Prinzip:

Gemessen wird die Extinktion des freien α-Amino-N, das heißt die Summe der α-Aminosäuren im 24 h-Urin, die mit o,5 % in n-Butanol gelöstem Ninhydrin einen komplexbildenden Farbstoff eingehen. Man benutzt hierzu eine Wellenlänge von 578 mμ. Mit Methanol füllt man nach dem Kochen die Proben, in denen ein pH-Wert von 6,5 herrscht, auf Marke 1o auf,

mischt gründlich und mißt die Extinktion. Eingestellt wird gegen den Leerwert, der gleich 0 gesetzt wird.

Trotz der einfachen Ausführung und den geringen Ausgangsmengen von o,1 ml Sammelurin bietet die Methode eine für klinische Routinemethoden voll ausreichende Empfindlichkeit und Exaktheit.

C. Bestimmung des freien α-Amino-N im 24 h-Urin

(nach MÜTING und KAISER (16))

1. Reagenzien:

a) Äthanol (96 %) - Aceton (Gemisch im Verhältnis 1:1)
Äthanol: Merck, p.a. 972 Mol.gew.: 46,07
Aceton: Merck, p.a. 14 Mol.gew.: 58,08

b) Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (pH 6,5):
18 ml o,5 m Na_2HPO_4 (Merck: 6580) werden mit o,5 m KH_2PO_4 (Merck: 4873) auf 5o ml und anschließend mit destilliertem Wasser auf 2oo ml aufgefüllt
Anm.: s.auch HINSBERG-LANG S. 133/135 (7)

c) Ninhydrin-Reagenz: o,5 g Ninhydrin (Merck p.a.: 6762-Mol. gew. = 178,15) in 1oo ml Butanol-(1) (Merck p.a.: 1990-Mol. gew. = 74)

d) Methanol (Merck p.a.: 6oo9-Mol. gew. = 32,o4)

e) Eichlösung: o,1 g Glycocollum nach SÖRENSEN (= Glycin) (Merck, s. Puffersubstanzen: 42o1-Mol. gew. = 75,o7) wird in 1oo ml destilliertem Wasser (= 1oo mg%) gelöst.

2. Ausführung der Bestimmung:

a) Versuchstechnik:

o,1 ml eines frischen 24 h-Urins wird in geeignete, auf 1o ml geeichte Reagenzgläser mit Schliffstopfen pipettiert. Nach Versetzen mit 1,5 ml des Äthanol-Aceton-Gemisches gibt man o,1 ml des Phosphatpuffers hinzu. Die dabei eventuell auftretende leichte Trübung bleibt unberücksichtigt.

b) Farbentwicklung:

Die jeweiligen Proben werden mit 1 ml Ninhydrin-Reagenz versetzt und fest verschlossen:
Man fette dazu ein Drittel des Schliffstopfens gut ein und verschließt das Schliffglas mit 4 über Kreuz angebrachten Federspiralen, um das Volumen konstant zu halten.

Die Proben werden im siedenden Wasserbad des Thermostaten bei 92°C und 14 Minuten lang gekocht. Anschließend stellt man die Röhrchen in Eiswasser, um die Reaktion zu unterbrechen.

c) Messung:

Die Reagenzgläser werden geöffnet, die Öffnung gut gesäubert und mit Methanol bis zur 1o ml-Eichmarke aufgefüllt, verschlossen und der Inhalt durch 8-1o faches Umdrehen gründlich gemischt. Man füllt die Proben in entsprechende Küvetten (Schichtdicke: 1 cm) und mißt die Extinktion bei 58o mμ (z.B. im Eppendorf- oder Beckman-Photometer) gegen den Nullwert.

d) Standardisierung und Berechnung:

Anhand entsprechender Eichkurven, welche in jeder Versuchsreihe unter Verwendung von o,o25 ml, o,o5 ml und o,1 ml des o,1 %igen Glycinstandards jeweils doppelt aufgestellt werden, wobei die Standardlösung stets mit destilliertem Wasser auf o,1 ml aufzufüllen ist, läßt sich der Gehalt der Probe an freiem α-Aminostickstoff ermitteln. Die aus der Eichkurve abgelesenen Werte werden in folgende Formel eingesetzt und die Menge an α-Aminostickstoff im Urin in mg/Tag angegeben:

$$\frac{\sigma \text{ x Urin-Vol./Tag}}{5,3} = \text{mg/Tag}$$

Hierbei stellt 5,3 den Umrechnungsfaktor der gefundenen Werte dar, der sich aus dem Anteil des Glycins am α-Aminostickstoff des Harns ergibt.

3. Eichkurve

Durch Verdünnung der o,1 %igen Glycinstandardlösung wurden Lösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Mit diesen wurde nach der Versuchsanordnung eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 1

Glycin in γ*	Extinktion (Mittelwert)	Streubreite**
15	o,15o	o,148 - o,152
3o	o,3oo	o,297 - o,3o2
5o	o,5oo	o,495 - o,5o7
75	o,755	o,75o - o,76o
9o	o,91o	o,9oo - o,92o

* Aus meßtechnischen Gründen anders gewählte Mengen an Glycinstandard

** maximale und minimale Abweichungen

Aus der Standardisierung der vorgelegten Bestimmung ist eine Definition des α-Aminostickstoffs ableitbar. Der α-Aminostickstoff ist derjenige Stickstoff, der in einer gewissen Menge Glycin als Bezugssubstanz enthalten ist.

Die Bestimmung erfolgt nach Ablauf der Ninhydrinreaktion durch Vergleich der Extinktion des Reaktionsgemisches der biologischen Flüssigkeit mit denen bekannter Glycinmengen.

Somit ist der α-Aminostickstoff der biologischen Flüssigkeit in äquivalenten Mengen des α-Aminostickstoffs des Glycins ausgedrückt. Damit ist die Problematik und Unsicherheit der Reaktion ebenfalls gekennzeichnet.

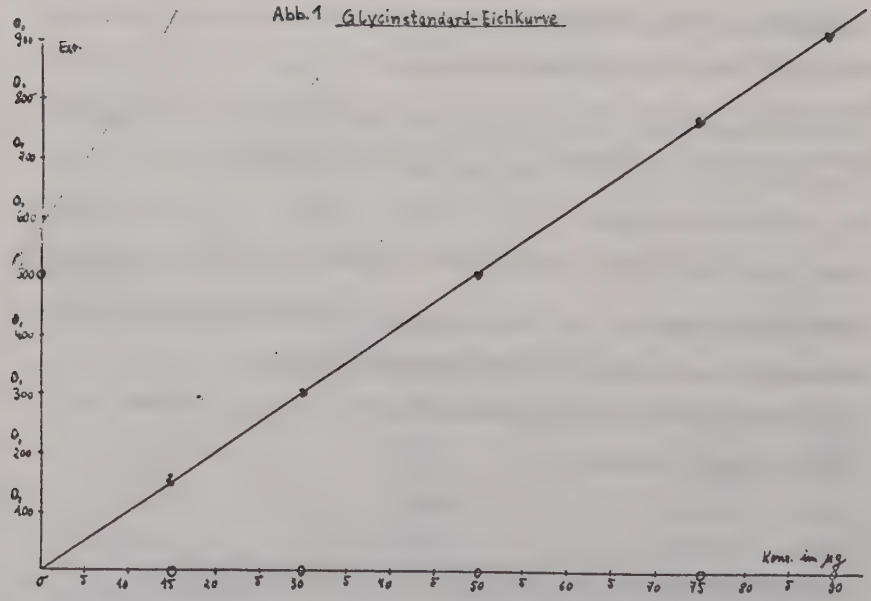
Die Farbintensität der gebildeten Chromogene in den Harnproben bezieht sich auf diejenige des Glycinstandards = 1,o (s. MÜTING und KAISER (16), 1963, S. 279). Die Zahl 5,3 in oben genanter Formel bezeichnet hierbei den Umrechnungsfaktor.

Abbildung 1 stellt die Glycinstandard-Eichkurve dar zur Bestimmung des freien α-Amino-N im 24 h-Urin.
Die Ergebnisse der Mittelwerte bei 15, 3o, 5o, 75 und 9o γ findet man in Tabelle 1.

D. Zusammenfassung der methodischen Verbesserungen

Vergleiche mit den früher üblichen Ninhydrin-Untersuchungen haben gezeigt, daß sie durch Verdampfungsverlust nicht streng reproduzierbar sind. Eigene Untersuchungen im geschlossenen System mit Rückflußkühler ergaben, daß der Siedepunkt des Reaktionsgemisches bereits bei 78°C (unter Normalbedingungen) lag. Die optimale Farbentwicklung bei der Ninhydrin-Reaktion läuft aber bei 92°C ab.
Somit muß der Dampfdruck des Reaktionsgemisches größer sein als 1 Atm. Es ergeben sich zwei Möglichkeiten, diesen Mangel der Methode zu beheben:

Abb. 1 Glycinstandard-Eichkurve



1. Eine Verbesserung des Verschlusses des Reagenzglases, in dem die Reaktion durchgeführt wird.

2. Siedepunktsdiagramm: Nämlich das "ternäre Gemisch" Aceton-Äthanol-Butanol so zu verändern, daß der Siedepunkt des Reaktionsgemisches gleich oder größer ist als die Temperatur der Reaktion.
   Da aber Unterlagen über das "ternäre Siedepunktsdiagramm" in der Literatur nicht angegeben waren, wurde eine Verbesserung des Testglasverschlusses durchgeführt. Vier Federspiralen wurden über Kreuz an den Häkchen des Schliffstopfens wie des Reagenzglases angebracht.

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen deutlich die Schwankungsbreite im Extinktionsbereich von o,1 ml Sammelurin bei Zehnerversuchen.

Abbildung 2 stellt die Beziehung zwischen Extinktion und Versuchsnummer auf bei Proben, zwar mit Schliffstopfen verschlossen, aber ohne Drahtspiralverschluß: hier schwanken die Werte in einem beträchtlichen Maße, da durch den Überdruck beim Kochen unterschiedlich viel Flüssigkeit verdampfte.

Abbildung 3: Hier liegen die Werte, von kleinen Schwankungen abgesehen, ziemlich konstant, aber auch im Mittel tiefer. Die Proben waren nämlich mit vier Federspiralen (über Kreuz)

Abb. 2 Beziehung zwischen Extinktion und Versuchsnummer bei Zehnfachbestimmungen von 0,1 ml 24h-Urin [V = 600 ml] bei 92°C und 14 min. Kochzeit

Proben ohne Drahtspiralverschluß

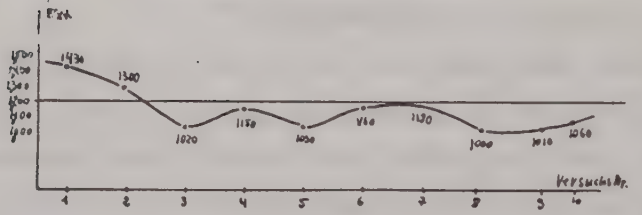
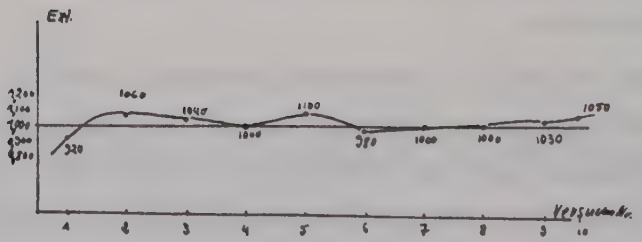


Abb. 3 Proben mit Drahtspiralverschluß [4 Federspiralen jeweils über Kreuz]

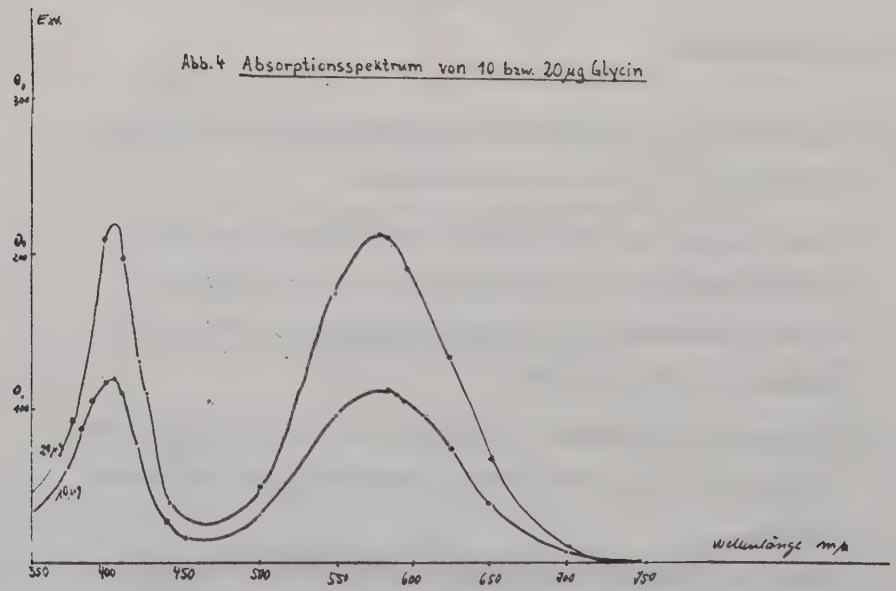


an den Häkchen der Schliffgläser und der Schliffstopfen befestigt. Somit konnte beim Kochen der Proben keine nachweisbare Flüssigkeitsmenge mehr entweichen.

Ziel der Arbeit:

1. Durch Wahl der geeigneten Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ein verlustfreies Arbeiten.
2. Durch Messen der Reaktionsgeschwindigkeit der Farbstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Temperatur eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bei vorgegebenem Reaktionsgemisch.
3. Prüfung des optischen Verhaltens des entwickelten Farbstoffs mit den in der Routine gebräuchlichen Filtergeräten:
   siehe Abbildung 4 des Absorptionsspektrums von 1o bzw. 2o µg Glycin:
   Das Absorptionsspektrum zeigt im Beckman-Photometer bei einer Wellenlänge von 4oo und 578 mµ die höchste Extinktion, die man bei 1o µg um o,11o, bei 2o µg um o,22o herum findet.
   Da man im mittleren Meßbereich des Eppendorf-Photometers am besten und exaktesten abliest, benutzt man hierzu ein

Abb. 4 Absorptionsspektrum von 10 bzw. 20 µg Glycin



Filter von 578 mμ.

4. Ausschluß optisch interferierender Substanzen, die möglicherweise in biologischen Materialien vorhanden sind (Eigenabsorption). o,1 ml der millimolaren Konzentration von Ammoniak und Ammoniumverbindungen tragen praktisch nicht zur Farbgebung bei. Theoretisch könnte ein Überschuß von Vitamin C im Urin eine Fehlerquelle darstellen (MÜTING und KAISER (16), 1963, S.279).

Tabelle 2

Farbintensität bei Verwendung von o,1 ml einer millimolaren Lösung, bezogen auf Glycin (16)

Verbindung	Farbintensität
α-Alanin	1,o6o
β-Alanin	1,o5o
α-Amino-buttersäure	o,83o
β-Amino-buttersäure	o,82o
γ-Amino-buttersäure	o,83o
Ammoniumchlorid	o,o26
Ammoniak	o,o26
Ammoniumoxalat	o,o3o
Arginin	o,66o
Arginin-hydrochlorid	o,83o
Ascorbinsäure	o,ooo
Asparagin	o,83o
Asparaginsäure	o,78o
Citrullin	1,ooo
Cystein	o,53o
Cysteinsäure	o,6oo
Creatinin	o,oo8
Dijodthyroxin	o,9oo

Fortsetzung Tabelle 2

Verbindung	Farbintensität
Dihydroxyphenylalanin	0,91o
Gudanidin	0,000
Glucose	0,000
Glutamin	1,000
Glutaminsäure	1,33o
Glutathion	0,83o
Glykocyamin	0,008
Glycin	1,000
Harnsäure	0,01o
Harnstoff	0,008
Histidin	0,72o
Histamin	0,21o
Homocystein	0,65o
Homocystein-thiolacton	0,23o
Homocystin	0,64o
Hydroxytyramin	0,056
Isoleucin	1,000
Leucin	1,000
Lysin	0,73o
Methionin	0,91o
Methioninsulfon	0,88o

Fortsetzung Tabelle 2

Verbindung	Farbintensität
Methioninsulfoxyd	0,650
Natriumsulfat	0,031
Norleucin	0,880
Norvalin	1,080
Ornithin	0,910
Hydroxyprolin	0,029
Penicillamin	0,025
Phenylalanin	1,000
Prolin	0,033
Serin	1,100
Taurin	0,660
Threonin	1,000
Tryptophan	0,770
Tyrosin	0,910
Valin	1,090

Anwendbarkeit (Kriterien)

1. Überprüfung der 24 h-Urinmenge durch Bestimmung des α-Amino-N/Kreatininquotienten war nicht angebracht,

da es sich bei den untersuchten Urinen um exakt gesammelte und abgemessene Urinmengen handelte.

2. Farbkonstanz:

Die Chromogene in den Harnproben erwiesen sich nur ca. 2 h beständig. Innerhalb der nächsten 1o - 2o h trat eine deutliche Aufhellung der Farbe ein, die anschließend unverändert blieb.

3. Reaktionszeit und Kochtemperatur:

Der Einfluß der Kochzeit spielt bei der Reaktion eine große Rolle. Eine Nachprüfung der Methode ergab eine Kochzeit der Harn- und Glycinproben von optimal 14 min. und eine Kochtemperatur von 92°C.

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit zwischen Extinktion und Kochzeit (bei konstanter Temperatur von 92°C) von 15 γ Glycinstammlösung. Dabei liegt das Optimum der Farbentwicklung bei 14 min.

Abbildung 6 stellt indes die Beziehung auf zwischen Extinktion und Kochzeit von o,1 ml 24 h-Urin, bei dem man ebenfalls eine optimale Farbgebung nach 14 min. feststellt.

4. Prüfung der Gleichmäßigkeit (o,1 ml Glycinstammlösung)

Es handelt sich dabei um Dreifachversuche.

Abb. 5 Abhängigkeit zwischen Extinktion und Kochzeit von 15 µg Glycin bei konst. Temperatur (92°C)

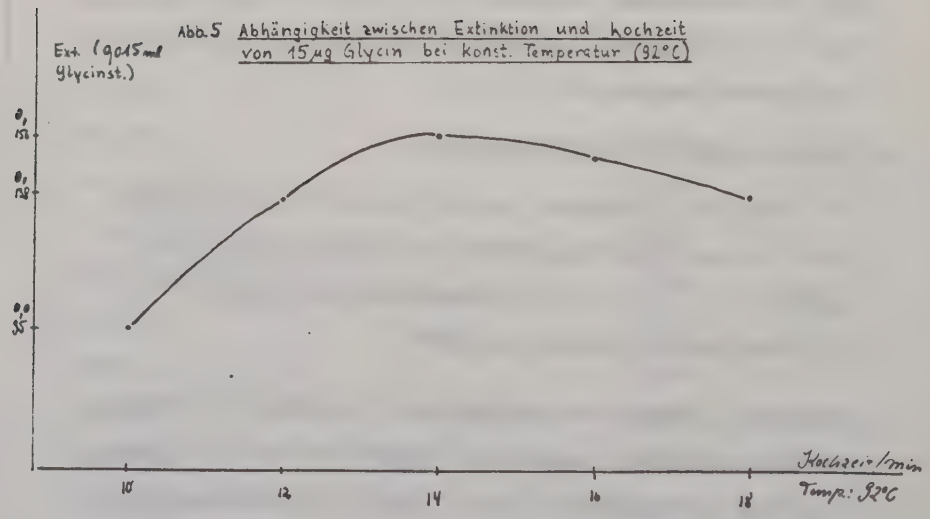


Abb. 6 Abhängigkeit zwischen Extinktion und Kochzeit von 0,1 ml 24 h-Sammelurin, dessen Menge 1600 ml beträgt

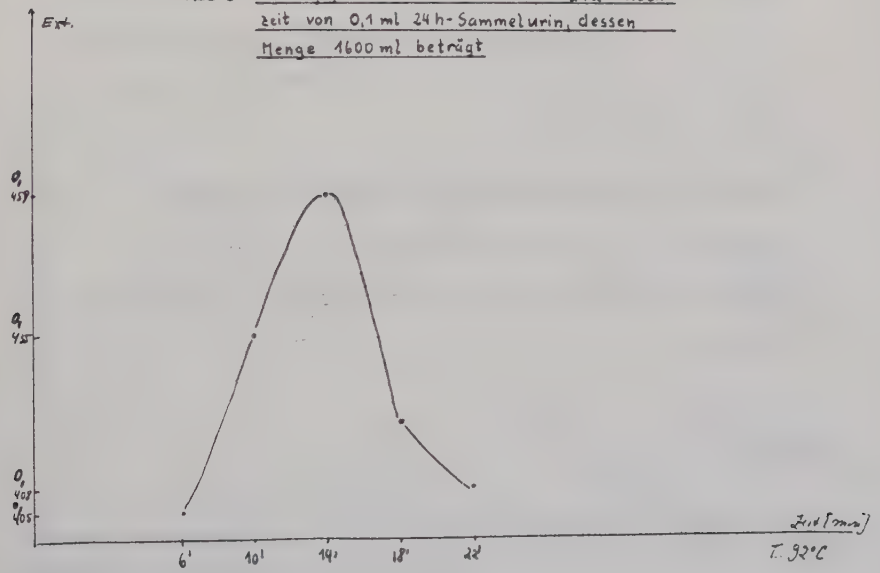


Abbildung 7 zeigt, daß bei jeweils konstanter Temperatur die Werte bei 85°C am meisten in ihrer Extinktion schwanken und am tiefsten liegen. Bei 88°C erreicht man schon gleichmäßigere Werte, die im Mittel höher liegen als bei 85°C. Bei 92°C schließlich erzielt man die beste Farbentwicklung und findet hierbei die geringste Schwankungsbreite bei Dreifachversuchen von o,1 ml Glycinstandard.

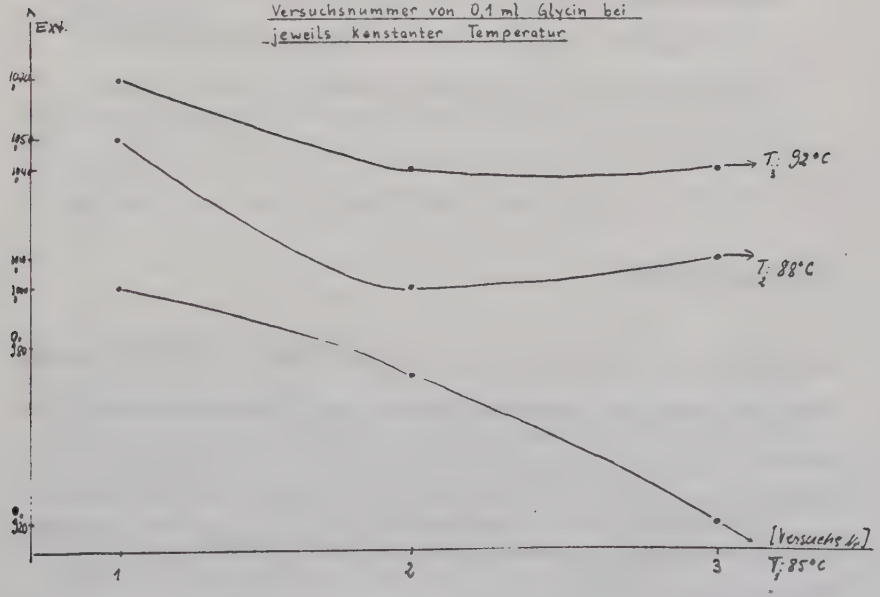
5. Einfluß von Lösungsmitteln (MÜTING und KAISER (16))

Abhängigkeit der Farbintensität des mit Glycin gebildeten Chromogens von dem zur Verdünnung benutzten Alkohol:

Tabelle 3

Lösungsmittel	λ max. (mμ)	Extinktion nach	
		0 h	3o h bei Raumtemperatur
Methanol	58o	o,61	o,61
Äthanol	565	o,648	o,59
Isopropanol	485	o,76	o,o9
n-Butanol	49o	o,75	o,25

Abb. 7 Abhängigkeit zwischen Extinktion und Versuchsnummer von 0,1 ml Glycin bei jeweils konstanter Temperatur



6. Abhängigkeit der Farbintensität vom pH des Phosphatpuffers (MÜTING und KAISER (16))

Im Verlauf der Untersuchungen mit Phosphatpuffer von verschiedenen pH-Werten fiel jedoch auf, daß die Intensitätskurve des mit Glycin gebildeten Chromogens in Abhängigkeit vom pH-Wert ein Maximum bei pH 5,8 besaß, während für Urin ein solches bei pH 6,5 ermittelt wurde.

E. Brauchbarkeit

Auf Grund der offensichtlichen Einfachheit kann die Methode ohne weiteres zur Routine-Analyse des α-Aminostickstoffgehalts in Harn, Serum, Liquor und anderen Körperflüssigkeiten herangezogen werden. Eine gut eingearbeitete technische Assistentin vermag etwa 3o Bestimmungen in 2 1/2 Stunden auszuführen.

F. Empfindlichkeit

Aus der Standardablesung (σ) bei niedriger Konzentration an α-Aminostickstoff (in verdünntem Urin) lassen sich

Rückschlüsse ziehen auf die Empfindlichkeit in der Methode. Die untere Erfassungsgrenze der Methode für Harn liegt in dem noch ablesbaren Bereich von etwa o,5 γ /Probe.

G. Spezifität

Sie wurde schon vorher bei den optisch interferierenden Substanzen, die möglicherweise in den Körperflüssigkeiten vorhanden sind, erörtert (MÜTING und KAISER, 1963 (16)).

H. Richtigkeit und Genauigkeit

Um die Exaktheit der Methode über eine längere Zeitspanne bei ein- und demselben Untersuchungsmaterial zu überprüfen, wurde eine Qualitätskontrolle nach BÜTTNER und STAMM (1) durchgeführt (1966). Einen wesentlichen Fortschritt in der Verbesserung der Zuverlässigkeit klinisch-chemischer Befunde hat man in den USA seit der Einführung der Qualitätskontrolle gesehen.

Abbildung 8 zeigt die Schwankungen der Extinktion von Doppelbestimmungen, die mit drei verschiedenen Substanzen über 3o Tage hinweg durchgeführt wurden.

a) Gemisch: o,1 ml (bestehend aus o,o9 ml 24 h-Urin und o,o1 ml Glycinstandard)

b) 24 h-Urin: o,1 ml (V = 12oo ml/die)

c) o,o1 ml Glycinstandard

Insgesamt wurden 15o Proben eingefroren, wovon je 5o aus Gemisch, 24 h-Urin und Glycinstandard bestanden. Täglich wurden 6 Proben aus dem Kühlschrank entnommen und untersucht. Ein Leerwert lief bei jeder Untersuchung mit, gegen den gemessen wurde.

Die Schwankungsbreite der Extinktion über die Zeit (3o Tage) erklärt die Tabelle 4. Die Extinktion wurde als Mittelwert berechnet:

Tabelle 4

bei o,o1 ml Glycinstandard	o,1o6 ± o,oo5
bei o,1o ml 24 h-Urin	o,545 ± o,o14
bei o,1o ml Gemisch	o,613 ± o,o15

Tabelle 5 gibt über die aus der Extinktion berechnete Konzentration Auskunft:

Tabelle 5

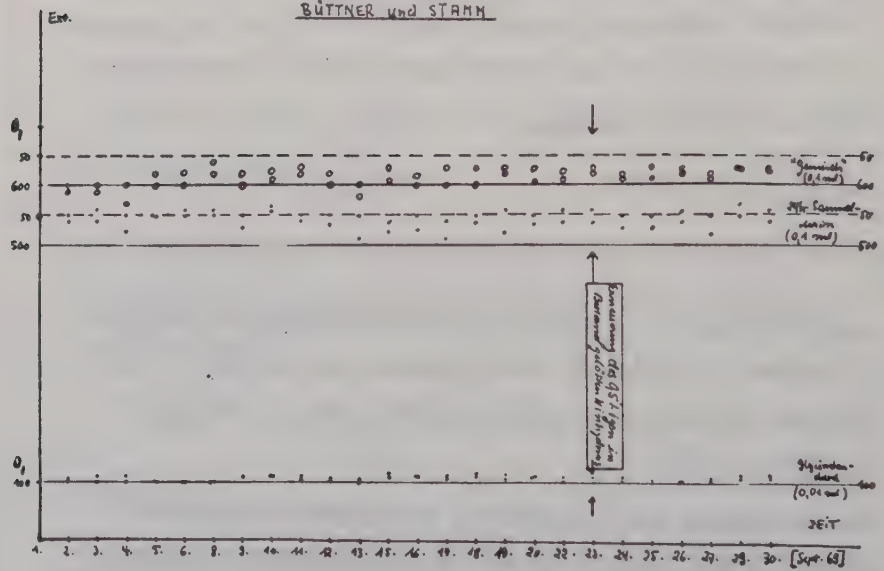
bei o,o1 ml Glycinstandard	1o,6 ± o,5	γ
bei o,1o ml 24 h-Urin	123,4 ± 3,16	mg/die

Aus Abbildung 8 ist auch die Wiederauffindung von Glycin im Gemisch ersichtlich. Dabei handelt es sich um o,1 ml Gemisch, das zu jeweils o,o9 ml Urin und 1o γ Glycinstandard bestand.

Die Extinktion des theoretisch errechneten Mittelwerts betrug o,5965, die des praktisch gefundenen Mittelwertes aber o,613.

Es wurde somit eine mittlere Schwankungsbreite von 97,3 - 1oo % zwischen beiden Mittelwerten gefunden.

Abb. 8 Genauigkeitskontrolle und Wiederauffindung nach BÜTTNER und STAMM



III. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Als Untersuchungspersonen dienten insgesamt 25o gesunde Erwachsene, davon 15o Männer und 1oo Frauen. Das Alter bei den Männern betrug 17 bis 78 Jahre, bei den Frauen 1o bis 82 Jahre. Die Körpergröße schwankte bei den Männern zwischen 156 und 195 cm, bei den Frauen zwischen 13o und 18o cm. Das Körpergewicht betrug bei den Männern 51 bis 95 kg, bei den Frauen 31 bis 95 kg. Die tägliche Urinmenge schwankte bei den Männern zwischen 52o und 2ooo ml, bei den Frauen zwischen 5oo und 2ooo ml.

Bei allen Untersuchten konnte anamnestisch, klinisch, biochemisch und röntgenologisch ein krankhafter Befund der inneren Organe ausgeschlossen werden.

Als Untersuchungsmaterial diente der frische 24 h-Urin, der in allen Fällen eiweiß- und zuckerfrei gefunden wurde. Im nativen 24 h-Urin wurde folgende chemische Untersuchung durchgeführt:

Die α-Aminostickstoffbestimmung nach der Ninhydrin-Methode von MOORE und STEIN (1o, 11) in der Modifikation von MÜTING und KAISER (16).

Dabei wurden noch einige eigene Veränderungen erarbeitet, die vor allem Temperaturhöhe, Länge der Kochzeit und Ver-

schluß der Testgläschen betreffen.

Außerdem wurde eine empfindliche Qualitätskontrolle der Methodik nach den Kriterien von BÜTTNER und STAMM (1) durchgeführt.

Tabelle 6: α-Amino-N Urin - gesunder Männer

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg.kg KG
1	B. Hans	38	1,64	58	56o	1o6	18,9	1,8
2	Sch. Hermann	61	1,72	68	52o	98	18,8	1,4
3	Sch. Ferdinand	51	1,7o	6o	65o	89	13,7	1,5
4	W. Horst	17	1,8o	62	6oo	126	2o,1	2,o
5	W. Johann	65	1,66	76	12oo	83	6,9	1,1
6	M. Herbert	64	1,67	87	8oo	125	15,6	1,4
7	L. Nasser	25	1,77	74	9oo	93	1o,3	1,3
8	K. Hermann	41	1,72	78	95o	122	12,8	1,6
9	J. Heinz	35	1,8o	74	8oo	114	14,2	1,5
1o	B. Albert	55	1,79	77	8oo	1o5	13,1	1,4
11	Sch. Josef	39	1,76	73	1ooo	132	13,2	1,8
12	W. Konrad	2o	1,73	68	56o	119	21,o	1,75
13	W. Reinhard	4o	1,78	86	7oo	6o	8,5	o,7
14	W. Franz	2o	1,76	7o	88o	124	14,o	1,8
15	P. Ludwig	66	1,64	64	8oo	134	16,7	2,1
16	H. Ignatz	36	1,72	79	1o5o	124	11,8	1,6
17	M. Hans	29	1,74	66	68o	132	19,4	2,o
18	J. Werner	32	1,74	71	6oo	112	18,6	1,6
19	H. Erhard	64	1,66	75	8oo	1o6	13,2	1,4
2o	L. Walter	32	1,64	54	14oo	169	12,o	3,1

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝-AN	Urin mg% ∝-AN	mg·kg KG
21	L. Jakob	47	1,7o	7o	8oo	66	8,2	o,9
22	Sch. Lothar	2o	1,7o	53	89o	117	13,1	2,2
23	F. Günter	21	1,65	56	63o	71	11,2	1,3
24	S. Engelbert	28	1,74	71	87o	1o6	12,1	1,5
25	B. Johann	27	1,67	75	1o2o	79	7,7	1,o
26	K. Adolf	34	1,72	72	1o7o	81	7,5	1,12
27	O. Herbert	36	1,7o	66	1ooo	94	9,4	1,42
28	Sch. Ewald	19	1,63	51	87o	128	14,7	2,51
29	W. Friedrich	24	1,73	7o	8oo	128	16,o	1,83
3o	M. Dieter	36	1,84	82	12oo	131	1o,9	1,59
31	R. Renno	61	1,76	8o	8oo	135	16,8	1,68
32	N. Heinrich	5o	1,76	72	15oo	138	9,2	1,91
33	N. Horst	16	1,66	54	68o	88	12,9	1,62
34	R. Hans	52	1,7o	59	75o	93	12,4	1,59
35	B. Klaus	2o	1,78	64	122o	137	11,3	2,14
36	M. Josef	64	1,68	65	125o	146	11,6	2,26
37	W. Otto	37	1,64	57	6oo	111	18,5	1,94
38	S. Ferdinand	75	1,79	59	13oo	1oo	7,7	1,56
39	G. Heinrich	37	1,67	6o	6oo	66	11,o	1,1o
4o	M. Gregor	42	1,71	7o	1ooo	151	15,1	1,16

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝-AN	Urin mg% ∝-AN	mg·kg KG
41	Sh. Kirumakki	27	1,64	58	7oo	81	11,5	1,4o
42	B. Erhard	29	1,82	82	59o	137	23,2	1,67
43	L. Werner	26	1,72	6o	67o	119	17,7	1,98
44	K. Karl	48	1,72	65	8oo	14o	17,5	2,31
45	B. Heinrich	45	1,72	69	122o	8o	6,5	1,16
46	H. Alois	23	1,7o	78	14oo	138	9,8	1,77
47	H. Siegfried	31	1,59	55	1o2o	125	9,8	2,27
48	E. Wilhelm	53	1,84	68	66o	66	11,o	o,97
49	Z. Herbert	29	1,76	56	52o	1o7	22,8	1,91
5o	R. Horst	27	1,8o	84	13oo	143	11,o	1,7o
51	F. Oswald	24	1,72	7o	83o	137	16,5	1,95
52	M. Walter	28	1,68	65	112o	114	1o,1	1,75
53	W. Günter	3o	1,73	69	88o	16o	18,2	2,31
54	H. Karl	54	1,68	7o	75o	1o1	13,4	1,44
55	K. Hans	38	1,86	82	126o	147	11,6	1,79
56	P. Jeremias	46	1,82	7o	11oo	137	12,4	1,95
57	L. Josef	26	1,73	69	1ooo	95	9,5	1,37
58	E. Arthur	26	1,78	8o	12oo	134	11,1	1,67
59	A. Gustav	49	1,72	65	125o	154	12,3	2,36
6o	W. Phillipp	41	1,65	73	87o	114	13,1	1,56

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝-AN	Urin mg% ∝-AN	mg·kg KG
61	K. Dieter	21	1,86	65	125o	132	1o,5	2,o3
62	S. Walter	31	1,81	83	11oo	121	11,o	1,45
63	S. Soddedim	31	1,7o	69	99o	135	13,6	1,95
64	D. Johann	52	1,64	74	61o	1o7	17,5	1,44
65	L. Richard	39	1,82	72	1ooo	111	11,o	1,55
66	D. August	33	1,68	64	1425	145	1o,1	2,26
67	S. Albert	4o	1,64	8o	12oo	112	9,3	1,4o
68	P. Andres	34	1,61	63	92o	88	9,5	1,39
69	W. Fritz	5o	1,67	67	8oo	125	15,6	1,86
7o	K. Max	4o	1,65	54	11oo	114	1o,3	2,11
71	H. Robert	24	1,68	65	8oo	134	16,7	2,o6
72	K. Heinz	33	1,67	66	1ooo	122	12,2	1,84
73	M. Nasser	23	1,76	72	8oo	97	12,1	1,34
74	U. Hugo	23	1,7o	63	125o	125	1o,o	1,98
75	D. Klaus	33	1,67	66	92o	1o5	11,4	1,59
76	M. Emanuel	27	1,7o	58	1ooo	9o	9,o	1,55
77	K. Manfred	19	1,78	73	55o	1o5	19,1	1,43
78	S. Martin	29	1,84	74	8oo	13o	16,2	1,75
79	B. Alois	48	1,73	7o	1ooo	128	12,8	1,82
8o	A. Klaus	23	1,75	71	9oo	7o	7,8	o,98

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝-AN	Urin mg% ∝-AN	mg·kg KG
81	D. Heinrich	22	1,78	7o	11oo	155	14,1	2,21
82	W. Erich	23	1,72	75	123o	134	13,1	1,77
83	H. Werner	31	1,64	64	74o	132	17,8	2,o6
84	S. Samuel	28	1,76	75	1ooo	166	16,6	2,21
85	B. Albert	35	1,77	74	85o	114	13,4	1,54
86	K. Eberhard	3o	1,8o	72	85o	1o7	12,5	1,48
87	B. Werner	41	1,79	75	12oo	132	11,o	1,76
88	K. Ernst	2o	1,68	63	8oo	122	15,2	1,93
89	R. Hans	23	1,72	66	8oo	98	12,2	1,48
9o	J. Alfred	28	1,75	71	1ooo	1o2	1o,2	1,43
91	L. Hans	36	1,77	74	54o	128	23,7	1,72
92	E. Otto	55	1,76	8o	9oo	1o5	11,7	1,31
93	P. Walter	44	1,65	73	8oo	121	15,1	1,65
94	B. Hermann	31	1,8o	73	8oo	133	16,6	1,82
95	L. Johannes	4o	1,69	65	1ooo	12o	12,o	1,84
96	B. Hans	27	1,72	63	75o	98	13,1	1,55
97	K. Ludwig	2o	1,7o	67	12oo	148	12,3	2,2o
98	Sch. Volker	25	1,84	81	125o	13o	1o,4	1,6o
99	Sch. Friedrich	59	1,75	76	125o	143	11,4	1,88
1oo	A. Wilhelm	43	1,7o	63	7oo	123	17,5	1,96

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝AN	Urin mg% ∝AN	mg·kg KG
1o1	B. Helmut	28	1,7o	59	112o	1o5	9,3	1,77
1o2	B. Anton	22	1,72	55	54o	123	22,5	2,25
1o3	D. Hans	24	1,84	78	125o	152	12,1	1,94
1o4	G. Edelbert	28	1,71	74	1o6o	154	14,5	2,o8
1o5	H. Eduard	31	1,75	66	1125	11o	9,7	1,51
1o6	H. Erwin	23	1,84	82	7oo	132	18,8	1,6o
1o7	K. Willi	52	1,73	83	8oo	115	14,3	1,38
1o8	L. Fritz	61	1,72	66	7oo	119	17,o	1,8o
1o9	S. Nikolei	32	1,72	68	88o	112	12,7	1,64
11o	M. Jonny	29	1,82	82	6oo	135	23,o	1,64
111	O. Jakob	49	1,8o	87	1ooo	116	11,6	1,33
112	O. Robert	43	1,74	79	915	148	16,1	1,87
113	R. Willi	61	1,72	8o	8oo	138	17,2	1,72
114	Sch. Ernst	55	1,66	53	12oo	124	1o,3	2,33
115	Sch. Peter	41	1,87	77	8oo	125	15,6	1,62
116	Sch. Karl-Heinz	26	1,71	66	8oo	128	16,o	1,93
117	W. Erich	34	1,7o	81	75o	137	18,2	1,69
118	W. Karl	37	1,7o	66	75o	74	9,8	1,12
119	Sch. Ernst	22	1,74	69	18oo	123	6,8	1,78
12o	B. Arthur	35	1,76	73	9oo	128	14,2	1,75

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg·kg KG
121	F. Franz-Josef	21	1,72	62	85o	129	15,2	2,o8
122	L. Hermann	46	1,8o	78	65o	124	19,1	1,58
123	J. Ernst	47	1,68	66,5	92o	78	8,5	1,17
124	B. Jakob	59	1,65	54	69o	75	1o,9	1,39
125	E. Volker	28	1,8o	7o	1ooo	117	11,7	1,67
126	H. Edgar	57	1,58	58	2ooo	98	4,9	1,7o
127	L. Ludwig	48	1,58	7o	13oo	1o1	7,8	1,44
128	E. Kunibert	26	1,72	63	95o	1o4	1o,9	1,65
129	E. Alois	72	1,56	66	75o	8o	1o,7	1,21
13o	H. Winfried	2o	1,76	66	9oo	89	9,9	1,35
131	I. Ababna	25	1,7o	61	9oo	91	1o,1	1,5o
132	T. Karl	34	1,8o	85	115o	116	1o,1	1,36
133	E. Otto	64	1,72	9o	19oo	163	8,6	1,81
134	R. Willi	56	1,68	81	95o	83	8,7	1,o2
135	M. Horst	31	1,7o	75	18oo	153	8,5	2,o4
136	Sch.Hans-Joachim	24	1,86	77	9oo	1o1	11,2	1,31
137	M. Heinz	17	1,73	68	13oo	1o4	8,o	1,53
138	F. Jürgen	27	1,76	8o	17oo	1oo	6,o	1,25
139	Sch. Jürgen	24	1,94	78	12oo	124	1o,3	1,6o
14o	Sch. Heinrich	54	1,87	82	11oo	1o3	9,4	1,26

Fortsetzung Tabelle 6

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg·kg KG
141	Sch. Wolfgang	23	1,76	71	1250	112	9,0	1,58
142	M. Wilhelm	78	1,64	60	850	55	6,5	0,92
143	N. Detlev	24	1,86	75	700	65	9,3	0,87
144	Sch. Bernd	25	1,95	86	1200	113	9,4	1,32
145	H. Willi	27	1,63	70	1100	115	10,5	1,64
146	Sch. Michael	23	1,69	75	1250	111	9,0	1,48
147	B. Hans-Joachim	26,	1,76	66	600	118	19,7	1,80
148	Sch. Karl-Ernst	26	1,78	83	1750	142	8,1	1,71
149	E. Karl	60	1,76	95	900	144	16,0	1,52
150	D. Haydar	25	1,70	61	900	110	12,2	1,80
	Mittelwert	36	1,73	70	961 ± 273	116 ± 23	12,8	1,67

Tabelle 7 α-Amino - N Urin - gesunder Frauen

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg·kg KG
1	B. Astrid	23	1,64	59	58o	113	19,4	1,9
2	I. Maria	22	1,67	64	69o	118	17,1	1,8
3	B. Hanna	38	1,64	58	56o	1o6	18,9	1,8
4	W. Karin	24	1,58	55	7oo	1oo	14,3	1,8
5	B. Franziska	25	1,6o	59	1ooo	143	14,3	2,4
6	N. Rosi	26	1,7o	63	6oo	1o2	17,o	1,6
7	Sch. Maria	61	1,72	68	52o	98	18,8	1,4
8	Sch. Else	37	1,65	72	115o	136	11,8	1,9
9	W. Katharina	51	1,7o	7o	78o	126	16,1	1,8
1o	Sch. Franziska	51	1,7o	6o	65o	89	13,7	1,5
11	W. Marianne	17	1,8o	62	6oo	126	2o,1	2,o3
12	M. Elisabeth	34	1,72	62	1ooo	137	13,7	2,2
13	L. Sigrid	28	1,69	58	78o	97	12,4	1,7
14	H. Erna	33	1,56	55	1ooo	1oo	1o,o	1,8
15	W. Gisela	2o	1,51	46	6oo	12o	2o,o	2,6
16	M. Hedwig	55	1,64	72	65o	91	14,o	1,3
17	W. Rita	22	1,61	53	97o	13o	13,3	2,4
18	B. Maria	62	1,6o	66	1ooo	12o	12,o	1,8
19	E. Helene	27	1,68	56	75o	11o	14,6	1,96
2o	W. Karoline	58	1,63	69	8oo	12o	15,o	1,7

Fortsetzung Tabelle 7

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝-AN	Urin mg% ∝-AN	mg·kg KG
21	F. Hildegard	31	1,72	7o	9oo	157	17,4	2,2
22	A. Marianne	23	1,64	64	1ooo	127	12,7	1,98
23	R. Ursula	4o	1,68	65	95o	137	14,4	2,1
24	B. Suzee	32	1,6o	68	6oo	15o	25,o	2,2
25	R. Johanna	26	1,64	6o	7oo	13o	18,6	2,2
26	R. Martha	55	1,68	65	75o	1o3	13,8	1,58
27	Sch. Hildegard	52	1,6o	75	975	141	14,4	1,9
28	M. Irmgard	23	1,64	51	5oo	87	17,4	1,7
29	R. Christa	34	1,64	52	5oo	77	25,4	1,5
3o	J. Anne	5o	1,55	68	68o	141	23,6	2,1
31	L. Rosa	46	1,62	68	5oo	112	2o,8	1,6
32	R. Martha	29	1,68	68	8oo	142	17,7	2,1
33	K. Ingeborg	28	1,58	5o	65o	127	19,5	2,5
34	H. Ella	4o	1,64	61	7oo	124	17,7	2,o
35	M. Gertrud	45	1,72	72	1o5o	131	12,4	1,8
36	J. Irene	29	1,51	42	8oo	127	15,8	3,o
37	B. Ute	15	1,68	57	13oo	96	7,3	1,7
38	K. Franziska	75	1,64	68	1ooo	119	11,9	1,75
39	Sch. Johanna	52	1,65	74	1ooo	115	11,5	1,5
4o	O. Liesel	31	1,64	65	915	148	16,1	2,3
41	K. Marlene	29	1,63	59	14oo	114	8,14	1,9

Fortsetzung Tabelle 7

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg.kg KG
42	Sch. Lina	39	1,62	7o	8oo	122	15,2	1,7
43	K. Anna	55	1,65	71	1ooo	116	11,6	1,6
44	K. Gerda	32	1,7o	68	75o	1o5	14,o	1,5
45	H. Ellen	31	1,64	6o	8oo	114	14,2	1,9
46	Sch. Ingrid	19	1,7o	71	1ooo	117	11,7	1,6
47	W. Vera	19	1,63	55	75o	131	17,4	2,4
48	F. Gisela	18	1,62	64	7oo	111	15,8	1,7
49	M. Anneliese	2o	1,68	63	8oo	127	15,9	2,o
5o	K. Beate	19	1,7o	65	75o	1o6	14,1	1,6
51	K. Ilse	21	1,68	68	92o	127	13,8	1,8
52	D. Else	35	1,67	59	12oo	12o	1o,o	2,o
53	B. Irmgard	26	1,65	68	8oo	135	18,8	2,o
54	Sch. Elisabeth	33	1,62	64	65o	1o2	16,4	1,6
55	H. Else	31	1,69	64	8oo	1o7	13,3	1,7
56	M. Waltraud	19	1,68	62	11oo	1oo	9,o	1,6
57	F. Käthe	35	1,66	64	6oo	1o5	17,5	1,6
58	B. Liesel	26	1,68	69	5oo	112	12,4	1,6
59	B. Auguste	33	1,68	58	76o	143	18,8	2,5
6o	Sch. Else	23	1,66	52	123o	111	9,o	2,1

Fortsetzung Tabelle 7

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg α-AN	Urin mg% α-AN	mg·kg KG
61	H. Monika	23	1,7o	57	1o2o	141	13,8	2,5
62	H. Irmgard	34	1,6o	5o	5oo	116	23,1	2,3
63	H. Johanna	4o	1,68	6o	13oo	117	9,o	1,95
64	H. Berta	45	1,65	7o	8oo	97	12,1	1,4
65	K. Paula	39	1,54	48	6oo	1o1	16,8	2,1
66	Sch. Katharina	49	1,53	55	8oo	1o5	13,1	1,9
67	S. Ute	23	1,73	64	1ooo	1o2	1o,2	1,6
68	M. Liesel	21	1,74	6o	66o	131	19,8	2,2
69	Sch. Helga	24	1,66	64	1ooo	143	14,3	2,2
7o	N. Ruth	44	1,74	73	12oo	133	11,1	1,8
71	H. Gerda	2o	1,67	66	1ooo	1o4	1o,4	1,6
72	D. Maria	18	1,68	68	11oo	11o	1o,o	1,6
73	E. Anna	42	1,63	68	9oo	128	14,2	1,9
74	Sch. Helene	35	1,61	62	1ooo	67	6,7	1,o8
75	Sch. Hannelore	42	1,68	68	125o	97	7,7	1,13
76	Sch. Justina	19	1,69	68	7oo	1o7	15,2	1,6
77	U. Martha	44	1,58	67	95o	129	13,5	1,9
78	F. Dorothea	1o	1,3o	31	51o	85	16,6	2,8
79	G. Elisabeth	59	1,6o	62	13oo	11o	8,4	1,77
8o	T. Sophie	56	1,5o	45	61o	115	18,8	2,5
81	S. Margret	38	1,63	6o	6oo	1o9	18,2	1,8

Fortsetzung Tabelle 7

Lfd. Nr.	N a m e	Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	ml Urin	Urin mg ∝AN	Urin mg% ∝AN	mg·kg KG
82	H. Hildegard	42	1,6o	56	19oo	136	7,2	2,43
83	W. Ella	75	1,6o	75	1ooo	94	9,4	1,25
84	D. Hanna	69	1,7o	71	1ooo	91	9,1	1,28
85	S. Netty	63	1,59	74	115o	59	5,1	o,8o
86	W. Hadwina	5o	1,63	6o	1ooo	126	12,6	2,1o
87	F. Hilde	52	1,62	63	19oo	79	4,2	1,25
88	M. Lieselotte	5o	1,68	64	6oo	54	9,o	o,84
89	W. Martha	48	1,7o	62	8oo	128	16,o	2,o7
9o	W. Heidi	27	1,68	55	16oo	6o	3,8	1,o9
91	Sch. Ruth	5o	1,73	75	7oo	83	11,5	1,11
92	Sch. Gisela	21	1,73	64	7oo	111	15,9	1,73
93	W. Emilie	82	1,65	85	2ooo	1o7	5,3	1,25
94	G. Ingeborg	57	1,65	64	14oo	47	3,4	o,73
95	G. Barbara	2o	1,76	6o	12oo	63	5,3	1,o5
96	W. Maria	74	1,5o	58	15oo	71	4,7	1,22
97	M. Katharina	77	1,54	69	75o	71	9,5	1,o3
98	H. Hilde	45	1,68	69	7oo	113	16,1	1,91
99	M. Irene	29	1,6o	62	148o	148	1o,o	2,39
1oo	H. Anneliese	57	1,65	95	95o	91	9,6	o,96
	Mittelwert	37	1,64	64	882 ± 28o	1o2 ± 21	13,4	1,8o

IV. ERGEBNISSE

Im folgenden sollen die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs bei den von uns untersuchten 25o gesunden Erwachsenen besprochen werden.

Als Grundlage hierfür werden - für beide Geschlechter getrennt - (siehe Tabelle 6 und 7) Alter, Größe, Gewicht, Urinmenge sowie der α-Aminostickstoffgehalt in mg/die, mg% und mg/kg Körpergewicht verglichen.

Die Mittelwerte der oben erwähnten Parameter sind auch auf Seite 42 (in Tabelle 6) für die 15o gesunden Männer und auf Seite 47 (in Tabelle 7) für die 1oo gesunden Frauen zu finden. Hier wird außerdem bei der Urinmenge und dem α-Aminostickstoffgehalt die mittlere Schwankungsbreite um den Mittelwert angegeben. Es handelt sich dabei um solche aus Fünffachbestimmungen.

Die Werte sollen im einzelnen besprochen werden:
Der Mittelwert an freiem α-Amino-N im 24 h-Urin gesunder Männer beträgt dabei 116 $\pm$ 23 mg/die in einer täglichen Urinmenge von 961 $\pm$ 273 ml. Dabei schwankt die tägliche

Ausscheidung an freiem α-Amino-N bei den 15o gesunden Männern von minimal 55 bis maximal 169 mg/die in einer Sammelurinmenge von wenigstens 52o bis höchstens 2ooo ml/die. Umgerechnet auf 1oo ml bedeutet das einen Mittelwert von 12,8 mg% (extreme Schwankungen betragen 4,9 und 23,2 mg%) und in kg Körpergewicht ausgedrückt einen Durchschnitt von 1,67 mg/kg (tiefster Wert bei o,7, höchster Wert bei 3,1 mg/kg).

Der Mittelwert an freiem α-Aminostickstoff im 24 h-Urin von 1oo gesunden Frauen beträgt dabei 1o2 ± 21 mg/die in einer täglichen Urinmenge von 882 ± 28o ml. Dabei liegt der minimale Wert der Konzentration an freiem α-Amino-N/die bei den 1oo gesunden Frauen um 47, der maximale Wert um 175 mg/die in einer täglichen Urinmenge, die von 5oo bis maximal 2ooo ml schwankt. Umgerechnet auf 1oo ml bedeutet das einen Durchschnittswert von 13,4 mg% freiem α-Amino-N, wobei die Werte von minimal 3,4 bis maximal 25,o mg% streuen und auf 1 kg Körpergewicht bezogen findet man im Mittel 1,8o mg/kg, wobei die Extremwerte o,7 und 3,o mg/kg betragen.

Die drei Parameter - Alter, Größe und Gewicht - werden nun im folgenden erläutert:

Im Mittel findet man bei den 150 gesunden Männern ein Lebensalter von 36 Jahren, das von 17 bis 78 Jahre schwankt. Die mittlere Größe beträgt 1,73 m, wobei der kleinste Mann 1,56 m groß, der größte 1,95 m groß ist. Das Durchschnittsgewicht liegt bei 70 kg, das bei den einzelnen Personen von 51 kg bis 95 kg streuen kann.

Die 100 gesunden Frauen sind im Durchschnitt 37 Jahre alt, wobei das Alter von 10 bis 82 Jahre schwankt. Die mittlere Größe ist 1,64 m. Die jüngste weibliche Person ist zugleich die kleinste mit 1,30 m, die größte ist 1,80 m groß. Das mittlere Körpergewicht liegt bei 64 kg, wobei die größten Abweichungen 31 kg und 95 kg darstellen.

Im folgenden werden 6 Abbildungen gezeigt, die an dieser Stelle erklärt werden sollen.

Dabei wird - bei Männern und Frauen getrennt - die Aminoacidurie Stoffwechselgesunder in Abhängigkeit gesetzt zu den drei Größen:
Lebensalter,
Körpergewicht und
täglich ausgeschiedener Urinmenge.

Abbildung 9 stellt die Beziehung auf zwischen 24 h-Urinmenge und der Konzentration an freiem α-Amino-N, also der Amino-

Abb. 9 Beziehung zwischen 24h-Urinmenge und Aminoacidurie von 150 gesunden Männern

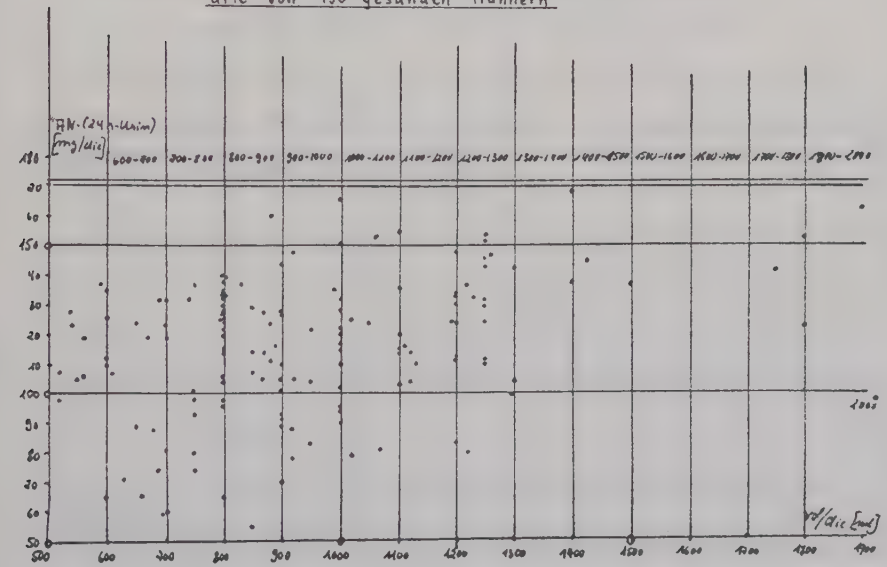
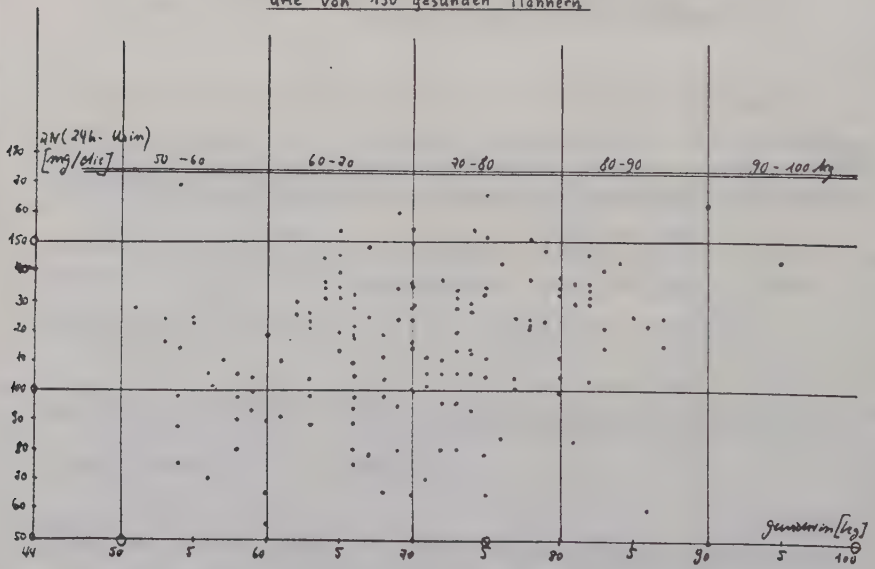


Abb. 10 Beziehung zwischen Körpergewicht und Aminoacid-urie von 150 gesunden Männern



acidurie von 15o gesunden Männern, wobei das Urinvolumen nach 1oo ml gestaffelt ist.

Dabei ist besonders die Verteilungshäufigkeit bei 8oo ml über eine Konzentration von 95 bis 14o mg α-Amino-N bemerkenswert, während eine solche Verteilung nur annähernd noch bei 1ooo und 125o ml zu finden ist. Die größte Ballung findet sich also im unteren bis mittleren Bereich der Urinmenge, während im Bereich von 13oo bis 2ooo ml nur noch vereinzelt Werte liegen.

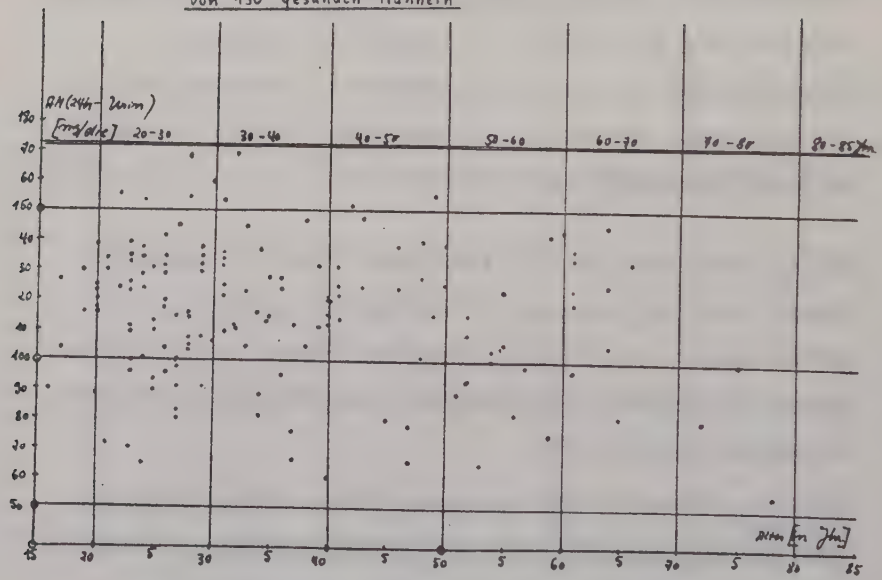
Analog dazu findet man in Abbildung 12 bei 1oo gesunden Frauen fast den gleichen Verteilungstyp, wobei aber die größte Ballung bei 1ooo ml Urinmenge liegt, wo die Konzentration an freiem α-Amino-N über eine Strecke von 9o bis 14o mg/die verteilt ist.

Abbildung 1o stellt die Beziehung auf zwischen Körpergewicht und Aminoacidurie von 15o gesunden Männern, wobei das Körpergewicht in Zehnerabschnitte gestaffelt ist.

Die Werte konzentrieren sich vor allem in der Mitte bei etwa 6o bis 82 kg und etwa 1oo bis 135 mg/die α-Amino-N. Im oberen Bereich von 83 bis 95 kg liegen nur noch vereinzelt Werte.

Analog dazu sieht man in Abbildung 13 bei 1oo gesunden Frauen die ungefähr gleiche Verteilung, nur daß im unteren

Abb. 11 Beziehung zwischen Alter und Aminoacidurie von 150 gesunden Männern



Bereich von etwa 4o bis 5o kg einige Werte zu finden sind und der obere Abschnitt von 75 bis 95 kg fast leer ist. Die Verteilung über die Aminoacidurie ist ungefähr dieselbe wie bei den Männern bei konstantem Gewicht.

Weiterhin interessierte die Frage, inwieweit die Aminoacidurie Stoffwechselgesunder möglicherweise vom Lebensalter abhängt.

Zu diesem Zweck wurde auf Abbildung 11 bzw. 14 - für 15o Männer und 1oo Frauen getrennt - die Beziehung zwischen Lebensalter und Aminoacidurie aufgestellt, wobei das Alter in Dezennien gestaffelt ist.

Die Verteilung konzentriert sich bei den Männern hauptsächlich im unteren Teil über einen Bereich von 2o bis 4o Jahre und noch einmal zwischen 45 und 65 Jahren, - aber weniger -, um von 65 bis 78 Jahre abzufallen. Von 2o bis 4o Jahre liegen die Aminoacidurie-Werte im Bereich von 9o und 145 mg/die, also im oberen Abschnitt, von 35 bis 75 Jahre aber weitgehend gleichmäßig verteilt.

Bei den Frauen herrscht ein besser über die Jahre hin verstreuter Verteilungstyp vor, wo auch im unteren Bereich von 18 bis 45 Jahre die meisten Werte liegen, aber gleichmäßiger verteilt sind als bei den Männern. Im oberen Ab-

Abb. 12 Beziehung zwischen 24h-Urinmenge und Aminoacid-urie von 100 gesunden Frauen

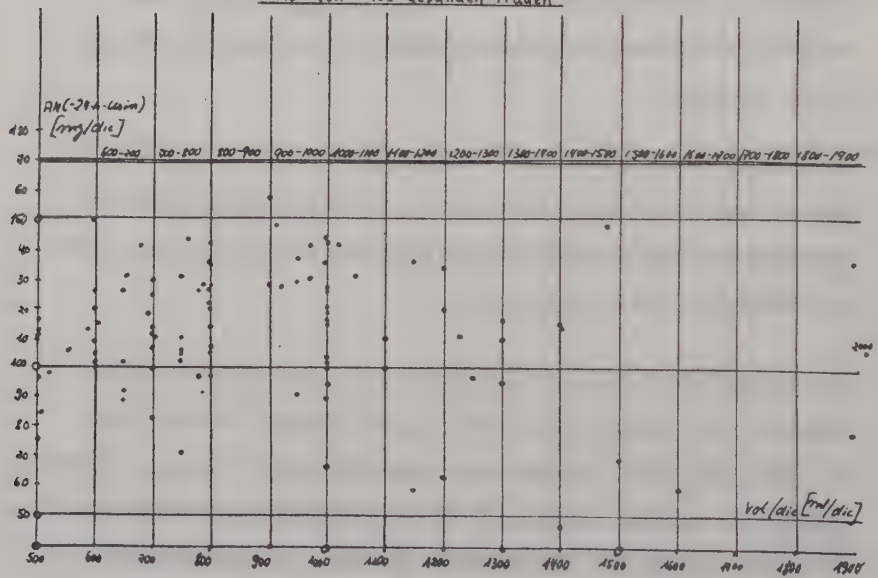


Abb. 13 Beziehung zwischen Körpergewicht und Aminoacidurie von 100 gesunden Frauen

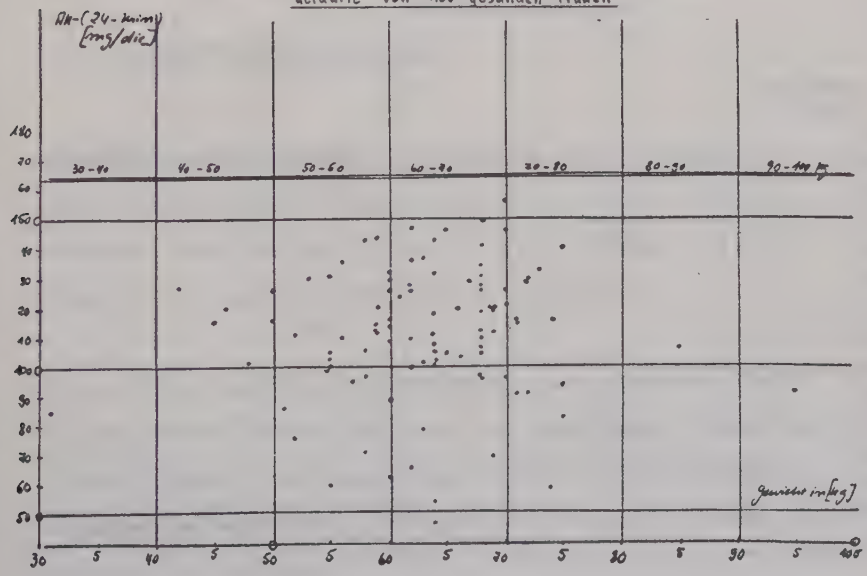
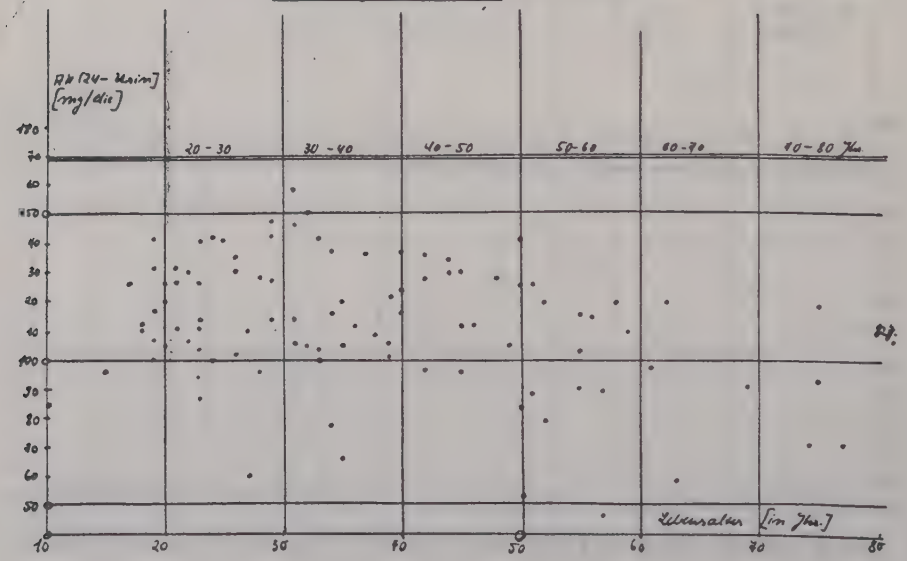


Abb. 14 Beziehung zwischen Alter und Aminoaciduric von 100 gesunden Frauen



schnitt von 5o bis 82 Jahre fällt ein weitgehender Konzentrationsabfall an freiem α -Aminostickstoff auf.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zusammenfassend muß man feststellen, daß bezüglich der Aminoacidurie eine Geschlechtsdifferenz nicht oder kaum besteht, denn die Absolutwerte in mg betragen bei den Männern 12,8 mg%, bei den Frauen 13,4 mg%.

Was die Abbildungen betrifft, haben wir keinerlei Verteilungskoeffizienten im Sinne der Gauß'schen Verteilung finden können, der irgendeinen Trend in einer Richtung zuläßt, da die Werte zu unregelmäßig über die Fläche hinweg verteilt liegen.

Man kann aber insgesamt sagen, daß in höherem Alter sich nur wenige Werte finden lassen, daß die meisten Personen zwischen 2o und 5o Jahre alt sind, daß die tägliche Urinmenge meist im Bereich von 6oo bis 13oo ml liegt, das Körpergewicht zwischen den Geschlechtern aber etwas variiert (Männer: 58 bis 82 kg, Frauen: 5o bis 75 kg) und die

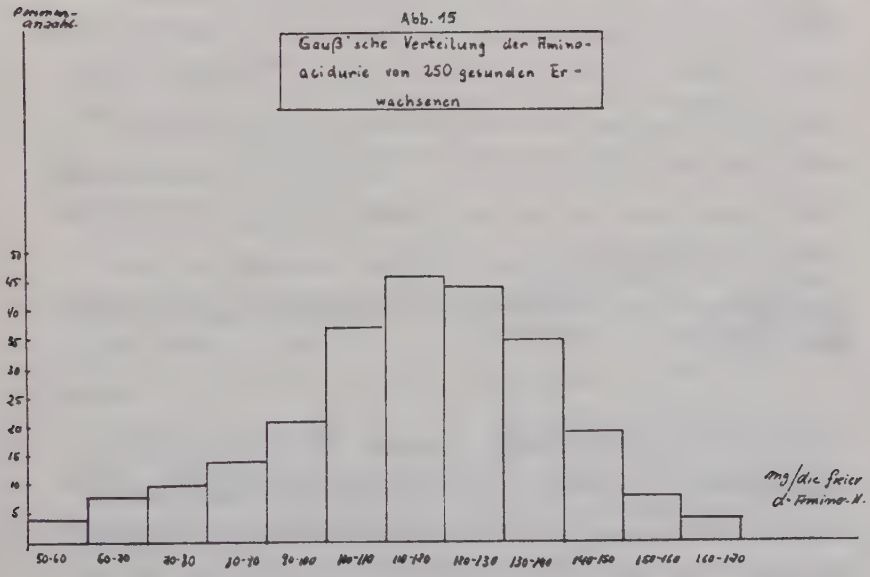
Aminoacidurie bei beiden im Hauptbereich von 8o bis 145 mg/die liegt, wobei die Werte meist zwischen 1oo und 15o mg/die konzentriert sind.

So kann man, da keine Geschlechtsdifferenz besteht, die Mittelwerte zusammenfassen und abschließend feststellen, daß die Aminoacidurie von gesunden Erwachsenen in dem Mittelbereich von 1o9 ± 44 mg/die liegt. Da eine binomische Verteilung nach Gauß bei den Werten von 25o gesunden Erwachsenen besteht, ist es der Bereich Mittelwert plus und minus zwei Standardabweichungen (s. Abb. 15).

Es ist grundsätzlich nicht richtig, wenn heute noch in manchen Lehrbüchern von einer Aminoacidurie bei dieser oder jener Krankheit gesprochen wird. Aminosäuren im Urin scheidet bereits jeder gesunde Mensch aus, was durch zahlreiche chemische, papierchromatographische und mikrobiologische Analysen belegt werden konnte. Gemeint ist lediglich eine Hyperaminoacidurie, eine vermehrte Ausscheidung von Aminosäuren im Harn. Die Aminosäurenausscheidung des gesunden Menschen ist, entsprechend dem Aminosäurenspiegel des Serum, abhängig vom Eiweißgehalt der Nahrung sowie der Resorption und besonders der Ausscheidung der Aminosäuren durch die Nieren.

Abb. 15

Gauß'sche Verteilung der Aminoaciduric von 250 gesunden Erwachsenen



Die Abhängigkeit der täglichen Aminosäurenausscheidung im menschlichen Harn von der Ernährung wurde früher schon einmal von einer Reihe von Autoren untersucht (LÖFFLER, GEROK (9)). Es wurde aber beim Menschen keine deutliche Abhängigkeit der Aminoacidurie von der biologischen Wertigkeit des Nahrungseiweißes festgestellt wie im Tierversuch. Während eine eiweißarme Kost über kürzere Frist ohne Auswirkung auf die Aminoacidurie ist, wirkt sich eine quantitativ und qualitativ unzureichende Eiweißzufuhr über längere Zeit auf den Aminosäuren-Haushalt des Menschen höchst ungünstig aus, wie das besonders bei der Dystrophie in der Nachkriegszeit beobachtet wurde (MÜTING, 1949 (12)).

Weiter bestehen Beziehungen zwischen Aminoacidurie und Körpergewicht. Besonders bei Aminosäurenbestimmungen im Harn von Säuglingen und Kindern wird die Aminosäurenmenge im allgemeinen auf kg Körpergewicht berechnet.

Erheblich beeinflußt wird die Aminosäurenausscheidung im Harn durch die Diurese, wie SCHMITZ und SIWON (19) bereits 1925 und später GOEBEL (5), SCHREIER (21), SOUCHON (23) feststellten und durch MÜTING (13, 15) bei kranken Erwachsenen bestätigt wurde.

Quantitative Bestimmungen verschiedener Aminosäuren im Erwachsenen-Urin wurden von einer Reihe von Autoren durchgeführt. Es handelt sich dabei vor allem um amerikanische Untersucher (ECHKARDT und DAVIDSON (3); van SLYKE, Mac FADYEN und HAMILTON (22); STEIN (26)). Der von ihnen im Urin nachgewiesene freie α-Aminostickstoff schwankt zwischen 1oo und 14o mg. Untersucht wurden, wenn auch häufig über mehrere Tage,von den verschiedenen Autoren nur 2 bis maximal 12 Personen.

MÜTING (14) führte an 4o gesunden Männern und Frauen Analysen durch, die später noch an weiteren Versuchspersonen ergänzt wurden. Alle Analysen wurden in eiweißfreiem frischem Urin durchgeführt und der freie α-Aminostickstoff erfaßt. Er fand bei 2o Männern einen errechneten Mittelwert von 1o5,8 mg/die, während der nach MOORE und STEIN (11) bestimmte Wert 122,5 mg/die beträgt.

Bei 2o Frauen fand MÜTING (14) einen solchen von 1o9,5 mg/die, während MOORE und STEIN (11) einen Wert von 134,8 mg/die angaben. Die Differenz zwischen dem errechneten und dem kolorimetrisch bestimmten freien α-Aminostickstoff im 24 h-Urin Gesunder erklärt sich dadurch, daß Glutamin zwar kolorimetrisch, aber nicht papierchromatographisch mitbestimmt wird.

Die Menge des α-Aminostickstoffs wird mit der sehr genauen gasometrischen Ninhydrinmethode von van SLYKE und Mitarbeitern (22) im Urin etwa genau so hoch angegeben wie von MÜTING (14), während bei der älteren Formoltitration auch ein Teil der peptidgebundenen Aminosäuren mit erfaßt wird. Die von MÜTING (14) gefundenen Werte für die einzelnen freien Harnaminosäuren liegen meist im Rahmen der vorwiegend mikrobiologischen Literaturangaben.

Die Summe der auf α-Amino-N berechneten, durch PCG erfaßten Aminosäuren ist nur 1o % geringer als der nach MOORE und STEIN (11) bestimmte.

Meine Werte liegen ungefähr zwischen dem oben angegebenen bei den Männern: 116 $\pm$ 23 mg/die, bei den Frauen um 1o2 $\pm$ 21 mg/die, also etwas niedriger.

Wenn man aber den Mittelwert von Frauen und Männern zusammen errechnet, entsprechen meine Analysen denen von MÜTING (14), nämlich 1o8 mg/die.

Bisher konnte aber noch keine verbindliche Aussage über die Mittelwerte von gesunden Erwachsenen gemacht werden, da ein größeres Kollektiv von über 1oo Personen noch nicht auf ihre Aminoacidurie untersucht worden war. Deshalb können die gefundenen Mittelwerte von 25o gesunden Personen als ein zuverlässiges Maß angesehen werden.

In den "Documenta-Geigy-Wissenschaftliche Tabellen", S. 662

findet man folgende Angaben über den freien α-Amino-N-Gehalt im 24 h-Urin von gesunden Erwachsenen:

$\bar{x}$ = 9o mg/die (Schwankungsbereich: 41 bis 133 mg/die) (25)

und als mg/kg Körpergewicht einen

$\bar{x}$ von 1,4 mg/kg (o,6 bis 2,1) (17)

Der hier zu 9o mg/die gefundene Mittelwert und die Extremwerte sind gewiß als zu gering zu erachten. Das liegt wahrscheinlich an der Methodik (Ionenaustauschverfahren (25)), bei dem die einzelnen freien Aminosäuren addiert wurden, Verluste von Aminosäuren aber unvermeidbar sind.

Der pro kg gefundene Mittelwert von 1,4 mg/kg (17) (o,6 bis 2,1) liegt auch unter dem von uns gefundenen von 1,7 mg/kg.

Zwischen dem Aminosäurengehalt des 24 h-Urins gesunder Männer und gesunder nicht gravider Frauen bestehen keine wesentlichen Unterschiede. Bei Kindern und besonders Säuglingen ist die Aminoacidurie etwas höher, wie bereits SCHREIER (2o) sowie SOUCHON und GRUNAU (24) berichtet haben. Bei weiblichen Versuchspersonen ließ sich in mg pro die etwas weniger freier α-Aminostickstoff im Urin nachweisen als bei Männern, dagegen ist die Aminoacidurie in mg/kg Körpergewicht mit 1,8o etwas höher als bei Männern (1,67).

Besonders hoch ist die Aminosäurenausscheidung von Frühgeborenen, die bis zu 15 % des gesamten Stickstoffes ausmachen kann. Als Grund dafür vermuten SOUCHON und GRUNAU (24) eine Frühreife der Leber.

Nach STRÖDER, GRUNHOFER und HEIM (27) existiert ein Tag-Nacht-Rhythmus der Aminoacidurie, wobei am Tage mehr Aminosäuren ausgeschieden werden als in der Nacht. Noch offen bleibt, ob die wechselnde Aminosäurenkonzentration des Harns von einer verminderten Rückresorption in den Tubuli oder einer vermehrten Konzentrationsfähigkeit des proximalen Tubulusabschnittes abhängt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die quantitative Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs mittels der Ninhydrin-Reaktion modifiziert von MÜTING und KAISER (16) noch einmal nachzuvollziehen und nach möglichen Fehlerquellen und Verbesserungen zu suchen. Schließlich wurde eine Genauigkeitskontrolle und die Wiederauffindung nach BÜTTNER und STAMM (1) durchgeführt, welche heute unentbehrlich ist als Voraussetzung für eine exakte Routinemethode.

Es wurden 4o gesunde Erwachsene auf ihre tägliche Urinaus-

scheidung an freiem α-Aminostickstoff untersucht und durch 21o gesunde Erwachsene ergänzt, die früher in demselben Labor nach der gleichen klinisch-chemischen Methode auf ihren Gehalt an freiem α-Aminostickstoff im 24 h-Urin überprüft worden waren.

A. Ergebnisse des methodischen Teils

1. Eine Verbesserung des Testglasverschlusses wurde durch vier Federspiralen erreicht, die über Kreuz an den Häkchen des Schliffglases und des Schliffstopfens angebracht, einen festen Verschluß bieten und garantieren, daß das Volumen konstant bleibt.

2. Die Länge der Kochzeit wurde auf 14 min. festgelegt sowohl für den Glycinstandard als auch für die Urinproben.

3. Durch das Messen der Reaktionsgeschwindigkeit der Farbstoffentwicklung wurde in Abhängigkeit von der Temperatur eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bei 92°C erreicht.
   Eine Überprüfung der Gleichmäßigkeit erbrachte bei dieser Temperatur die beste Farbstoffentwicklung und auch die geringste Schwankungsbreite in der Extinktion

bei Dreifachversuchen von o,1 ml Glycinstandard.

Um die Exaktheit der Methode über eine längere Zeitspanne (3o Tage) bei ein und demselben Untersuchungsmaterial zu überprüfen, wurde eine Qualitätskontrolle nach BÜTTNER und STAMM (1) durchgeführt (1966). Die Schwankungsbreite der Extinktionswerte über längere Zeit und als Mittelwert berechnet, brachte befriedigende Ergebnisse.

Die Wiederauffindung von Glycinstandard im Gemisch ergab zwischen theoretisch und praktisch gefundenem Wert einen geringfügigen Verlust von 2,7 %.

B. Ergebnisse des physiologischen Teils

Bei 15o gesunden Männern wurde in einer täglichen Urinmenge von 961 ± 273 ml eine Aminoacidurie von 116 ± 23 mg/die gefunden. Bei 1oo gesunden Frauen dagegen wurden in einer täglich ausgeschiedenen Urinmenge von 882 ± 28o ml 1o2 ± 21 mg/die nachgewiesen. Es ließ sich hinsichtlich der Aminoacidurie von 25o gesunden Erwachsenen also kein Geschlechtsunterschied feststellen, da die Absolutwerte in mg% bei beiden Geschlechtern ungefähr gleich hoch lagen.

Außerdem interessierte bei beiden Gruppen noch die Frage,

inwieweit der Gehalt an freiem α-Aminostickstoff im Urin von der Körpermasse und vom Lebensalter abhängt.
Es fand sich bei Männern und Frauen eine Beziehung zwischen Aminoacidurie und Körpergewicht dergestalt, daß beim männlichen Kollektiv ein Mittelwert von 1,67 mg/kg, beim weiblichen von 1,8o mg/kg festgestellt wurde. Dem entspricht aber beim männlichen Geschlecht ein Körpergewicht von 7o kg gegenüber einem Mittelwert bei den Frauen von nur 64 kg.
Das Lebensalter war mit 36 Jahren bei beiden Kollektiven etwa gleich hoch. Es konnte weder bei Männern noch bei Frauen eine sichere Abhängigkeit zwischen Lebensalter und Aminoacidurie aufgestellt werden.
Man kann daher - da eine Geschlechtsdifferenz nicht besteht - die Mittelwerte beider Gruppen zusammenfassen, was einem Mittelwert von 1o9 $\pm$ 44 mg/die entspricht. Die Streubreite innerhalb von zwei Standardabweichungen folgt dabei dem binominalen Verteilungssatz von Gauß.

Bisher wurde in der Weltliteratur bei keinem größeren Kollektiv von gesunden Erwachsenen der Gehalt an freiem α-Aminostickstoff im 24 h-Urin untersucht.
Papierchromatographisch entspricht die Summe der Stickstoffanteile der einzelnen getrennten freien α-Aminosäuren im Urin dem von uns kolorimetrisch bestimmten freien

α-Aminostickstoff. Dabei lag der Gehalt der einzelnen Aminosäuren um 1o % niedriger als der von MOORE und STEIN (1o, 11) und MÜTING (14) bestimmten freien α-Aminostickstoffe, da Glutaminsäure als freies Glutamin mit der papierchromatographischen Methode nicht miterfaßt wurde. Die in der Literatur teilweise mit anderen Methoden angegebenen Werte konnten von uns bestätigt werden.

Insgesamt stellt die geschilderte Methodik zur Bestimmung des freien α-Aminostickstoffs in biologischen Körperflüssigkeiten einen wesentlichen Fortschritt für die klinische Routinediagnostik dar, da das Verfahren genügend empfindlich, spezifisch und relativ einfach auch im klinischen Laboratorium durchführbar ist.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

(1) BÜTTNER, H. und STAMM, D.

Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Untersuchungen.

Zschr.klin.Chem. 6, 303-306 (1966)

(2) CREMER, H.D. und FÜHR, J.

Zusammenstellung von Aminostickstoff-Werten pro die bei normalen Erwachsenen.

in: Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse 5, 447-665 (1953)

herausgegeben von HOPPE-SEYLER-THIERFELDER

(3) ECHKARDT, R.D. und DAVIDSON, C.S.

Urinary excretion of amino acids by a normal adult receiving diets of varied protein content.

J.biol.Chem. 177, 687 (1949)

(4) FISCHER, E.

Fraktionierte Destillation mit Estern, zit. von Tropon - Medizin von heute - Heft 3 (1964)

Grundriß der physiologischen Chemie, 1. Teil von Dr.med. J. HEINZLER, S. 129

(5) FOLIN, O.

A colorimetric determination of the amino-acid nitrogen in normal urine

J.biol.Chem. 51, 393 (1922 b)

(6) GOEBEL, F.

Über die Aminosäurenfraktion im Säuglingsharn.

Zschr.Kinderheilk. 34, 94 (1923)

(7) HINSBERG, K. und LANG, K.
Chemismus der Ninhydrinreaktion
Med.Chem. für den klin. und theoret. Gebrauch, Verlag Urban und Schwarzenberg (1951)

(8) LINDERSTRÖM-LANG, K. und HOLTER, H.
Notiz über Säuretitration von Betain in Aceton
Biochem.Zschr. 267, 45-47 (1933)

(9) LÖFFLER, W. und GEROK, W.
Die Aminosäurenausscheidung im Urin bei Hepatitiskranken und Gesunden während normaler und eiweißreicher Kost
Ärztl.Forschung 9, 4o3 (1955)

(1o) MOORE, S. und STEIN, W.H.
Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids
J.biol.Chem. 176, 367 (1948)

(11) MOORE, S. und STEIN, W.H.
A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds
J.biol.Chem. 211, 9o7 (1954 b)

(12) MÜTING, D.
Beitrag zur Diagnostik von Eiweißmangelschäden (Bestimmungen des Aminostickstoffs im Serum und Urin bei 3o Dystrophikern aus dem Jahre 1947)
Zschr.inn.Med. 5o (1949)

(13) MÜTING, D. — Die tägliche Methioninausscheidung im Urin Gesunder und Kranker, Methioninstudien, III. Mitteilung
Zschr.klin.Med. 150, 1 (1952)

(14) MÜTING, D. — Der Aminosäurengehalt des menschlichen Urins
HOPPE-SEYLER's Zschr. physiol.Chem. 297, 61-67 (1954)

(15) MÜTING, D. — Über den Aminosäurenhaushalt bei Diabetes mellitus
Klin.Wschr. 825 (1955)

(16) MÜTING, D. und KAISER, E. — Zur quantitativen Bestimmung von α-Aminostickstoff in biologischem Material mittels der Ninhydrin-Reaktion
HOPPE-SEYLER's Zschr. physiol.Chem. 332, 276-281 (1963)

(17) O'BRIEN und IBBOTT — Zusammenfassung verschiedener Werke aus der Literatur und Werte der Autoren
Herausgegeben von: Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicro-Biochemical-Techniques, 3. Aufl. Hoeber, Harper & Row, New York, S.30. (1962)

(18) POPE, C.G. und STEVENS, M.F. — The determination of Amino-Nitrogen using a copper method
Biochem.J. 33, 1070 (1939)

(19) SCHMITZ, E. und SIWON, D.
Niere und Aminosäureausscheidung
Biochem.Zschr. 160, 1 (1925)

(20) SCHREIER, K. und PLÜCKTHUN, H.
Über die Aminosäuren
Zschr.Kinderheilk. 67, 480 (1950 b)

(21) SCHREIER, K. und SZYBKO, V.
Der Aminosäurenstoffwechsel beim Diabetes mellitus
Klin.Wschr. 31, 430 (1953)

(22) SLYKE, D.D. van, Mac FADYEN, D.A. und HAMILTON, P.B.
The gasometric determination of amino-acids in urine by the ninhydrin-carbon dioxide method
J.biol.Chem. 150, 251 (1943)

(23) SOUCHON, F.
Papierchromatographische Untersuchungen der freien Aminosäuren im Säuglingsharn
Zschr. ges.exp.Med. 118, 219 (1952)

(24) SOUCHON, F. und GRUNAU, G.
Zur Aminosäurenausscheidung bei Frühgeborenen
Arch.Kinderheilk. 144, 143 (1952)

(25) SOUPART, P.
Urinary excretion of free amino-acids in normal adult men and women (Werte von 6 Männern und 9 Frauen, bestimmt mittels Ionenaustauschs)
Clin.chim.Acta 4, 265 (1959

(26) STEIN, W.H.
A chromatographic investigation of the amino-acid constituents of normal urine
J.biol.Chem. 201, 45 (1953)

(27) STRÖDER, J., GRUNHOFER, H. und HEIM, L.
Aminosäurenausscheidung und Nierenfunktion Frühgeborener
Annal.Paediat. 180, 52 (1953)

(28) TISELIUS, A.
Electrophoresis of serum globin
Biochem.J. 31, 313 (1937)

(29) WILLSTÄTTER, R. und WALDSCHMIDT-LEITZ, E.
Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden
Ber.Dtsch.Chem.Ges. 54, 2988 (1921)

(30) YOSHIDA, T.
Über die Formoltitration der Aminosäuren im Harn
Biochem.Zschr. 23, 239 (1909)

Lebenslauf

Als Sohn des Bundesbahnbeamten Heinrich Schombert und seiner Ehefrau Ruth, geb. Fries, beide evangelisch, wurde ich am 9. Januar 1945 in Jägersburg/Saar geboren. Ich habe noch eine drei Jahre jüngere Schwester.

Nach 4 Jahren Volksschule in Jägersburg trat ich dann in das Neusprachliche Gymnasium in Homburg/Saar ein, an dem ich am 11. März 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Am 3. Mai 1964 begann ich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken mein Medizinstudium, an der ich am 4. August 1965 die naturwissenschaftliche Prüfung bestand. Anschließend setzte ich mein Studium in Homburg fort. Hier absolvierte ich am 4. April 1968 die ärztliche Vorprüfung.

Im Frühjahr 1971 werde ich das medizinische Staatsexamen ablegen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Müting danke ich für die Überlassung des Themas und die Anleitung zur Durchführung der Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Dr.rer.nat. H.E. Keller für sein reges Interesse und seine Anregungen bei der chemisch-methodischen Durchführung danken.

Für die praktischen Anleitungen im klinisch-chemischen Labor - was die experimentelle Arbeit betrifft - bin ich besonders unseren chemischen Laborantinnen Frau Heinze, Frau Koch und Frau Wabnitz zu Dank verpflichtet.